

**TESIS DOCTORAL****2016**

**Estudio del Sistema Cannabinoide Endógeno en  
Ratas Lewis y Fischer 344: Un Modelo Animal de  
Vulnerabilidad Genética al Consumo de Drogas**

**SANTIAGO MORALES CORIA**

**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
PSICOLOGÍA DE LA SALUD**

**DIRECTORES:**

**ALEJANDRO HIGUERA MATAS  
EMILIO AMBROSIO FLORES**

Investigación financiada por: Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyectos: PSI2010-20355 y SAF2013-47520-P); Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Red de Trastornos Adictivos- Proyecto.: RTA- RD12/028/0020 del Instituto de Salud Carlos III y Plan Nacional sobre Drogas, Proyecto: 2012I057); Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (Proyecto : S-2011/BMD-2308; Programa de Actividades I+D+I CANNAB-CM); UNED (Plan de Promoción de la Investigación) y la Unión Europea (Proyecto: JUST/2013/DPIP/AG/4823-EU MADNESS)

## **Agradecimientos**

Un trabajo así siempre es una labor colectiva. Sin vosotros, que me enseñásteis, me orientásteis, me ayudasteis, me animásteis, me consolásteis, os reísteis conmigo y me aguantásteis, esto no hubiera sido posible.

A Emilio, sin él jamás habría participado del mundo de la investigación.

A Alejandro, por ser un amigo además de excelente director.

A toda la gente maravillosa que he disfrutado conociendo en estos años en la UNED. Desde las limpiadoras a los Doctores, pasando por los vigilantes, los cristaleros, administrativos, personal de cafetería, técnicos de laboratorio, profesores, y, por supuesto, mis compañeros becarios, habéis estado ahí siempre que os he necesitado. Solo por conoceros hubiera merecido la pena.

A mi familia y amigos. Sin vosotros no soy nada.

A mi madre.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 El sistema endocannabinoide</b> .....	1
1.1.1. Endocannabinoides .....	3
1.1.2. Biosíntesis, liberación, recaptación y degradación de los endocannabinoides.....	9
1.1.3. Receptores de cannabinoides.....	14
1.1.4. Cannabinoides y sistema inmune .....	30
<b>1.2 El sistema opioide endógeno</b> .....	34
1.2.1. Opioides endógenos.....	35
1.2.2. Receptores opioides .....	40
<b>1.3 Interacciones entre los sistemas endógenos cannabinoide y opioide</b> .....	48
<b>1.4 Modelos animales y adicción a opiáceos: La autoadministración en ratas Lewis y Fischer344</b> .....	50
<b>2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	64
<b>3. OBJETIVOS EXPERIMENTALES</b> .....	66
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	68
<b>4.1 Sujetos</b> .....	69
<b>4.2 Autorradiografía de receptores cannabinoides</b> .....	69
4.2.1. Análisis cuantitativo de los autorradiogramas.....	71
<b>4.3 Autoadministración intravenosa de drogas</b> .....	72
4.3.1. Introducción a la autoadministración intravenosa de drogas.....	72
4.3.2. Equipos utilizados en la administración intravenosa de drogas .....	74
4.3.3. Técnica quirúrgica .....	74
4.3.4. Compuestos empleados en la autoadministración.....	75
4.3.5. Procedimiento experimental .....	76
<b>4.4 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa –qPCR-</b> .....	79
4.4.1. Introducción a la qPCR .....	79
4.4.2. Protocolo de qRT-PCR realizado .....	80
<b>4.5 Análisis estadístico</b> .....	85
<b>5. RESULTADOS</b> .....	87
<b>5.1. Resultados: autorradiografía cuantitativa de receptores de cannabinoides.</b> .....	88

<b>5.2. Resultados: qRT-PCR. Expresión génica basal de enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides y de sus principales receptores.....</b>	<b>95</b>
<b>5.3. Resultados: autoadministración intravenosa del agonista sintético de receptores cannabinoides WIN 55,212-2.....</b>	<b>99</b>
<b>5.4. Resultados: autoadministración intravenosa de morfina y extinción de dicha conducta.....</b>	<b>106</b>
<b>5.5. Resultados: qRT-PCR. Influencia de la autoadministración de morfina en la expresión génica de enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides y de sus principales receptores.....</b>	<b>111</b>
5.5.1. Corteza Prefrontal.....	111
5.5.2. Núcleo accumbens.....	116
5.5.3. Bazo.....	120
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
<b>6.1. Parámetros del sistema endocannabinoide de las razas de rata Lewis y Fischer 344 a nivel basal.....</b>	<b>126</b>
<b>6.2. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2, de morfina y extinción de estas conductas en ratas Lewis y Fischer 344.....</b>	<b>129</b>
<b>6.3. Influencia de la autoadministración de morfina en la expresión génica de enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides y de sus principales receptores.....</b>	<b>133</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>142</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AG:** 2-araquidonoilglicerol.
- AA:** Ácido araquidónico.
- ABHD:**  *$\alpha$ ,  $\beta$ , hydrolase fold domain containing.*
- AC:** Adenilato ciclasa.
- ACTH:** Adrenocorticotropina.
- cADN:** Ácido desoxirribonucleico complementario.
- AEA:** N-araquidonoiletanolamina. Anandamida.
- AIBP:** *Anandamide intracellular binding proteins.*
- Ala:** Alanina.
- AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico.
- ANOVA:** *Analysis of variance.*
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- ATV:** Área tegmental ventral.
- BSA:** Albúmina de suero bovino.
- Ca<sup>2+</sup>:** Ión calcio.
- CCK2:** Receptor de colecistoquinina 2.
- CD8:** Cúmulo de diferenciación 8.
- Con A:** Concanavalina A.
- COX-2:** Ciclooxygenasa 2.
- CPu:** Núcleos caudado y putamen.
- CREB:** *cAMP response element binding protein.*
- Ct:** *Cycle threshold.*
- DAGL:** Diacilglicerol lipasa.
- DAMGO:** [D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly-ol<sup>5</sup>]-*Enkephalin.*
- DAT:** Transportador de dopamina.
- DEPC:** Dietilpirocarbonato.
- DOPAC:** Ácido dihidroxifenilacético.
- DPDPE:** [D-Pen<sup>2,5</sup>]-*Enkephalin.*
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- Eje H-H-A (HPA):** Eje hipotalámico hipofisario adrenal (hipotálamo pituitaria adrenal).
- EMT:** *Endocannabinoids membrane transporter.*
- ERK:** *Extracellular signal-regulated kinases.*

**F344:** Fischer 344.

**FAAH :** Amido-hidrolasa de ácidos grasos.

**FAN:** *Fas associated neutral sphingomyelinase.*

**FLAT:** *FAAH-1 like anandamide transporter.*

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

**G<sub>i</sub>:** Proteína G inhibitoria.

**Gln:** Glutamina.

**GPCR:** *G protein coupled receptor* (Receptor acoplado a proteína G).

**HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico.

**His:** Histidina.

**IL:** Interleuquina.

**Ile:** Isoleucina.

**IFN-  $\gamma$ :** Interferón gamma.

**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato.

**LC:** Locus coeruleus.

**LCE:** Laberinto en cruz elevado.

**LGP:** Núcleo lateral del globo pálido.

**LEW:** Lewis.

**LPI:** Lisofosfatidilinositol.

**LTD:** *Long-term depression.*

**LTP:** *Long-term potentiation.*

**Lys:** Lisina.

**MAGL:** Monoacilglicerol lipasa.

**MAPK:** *Mitogen activated protein kinases.*

**MSH:** Hormona estimulante de melanocitos.

**MSN:** Neurona espinosa de tamaño medio.

**NAAA:** *N-Acylethanolamine-Hydrolyzing Acid Amidase.*

**NAcc:** Núcleo acumbens.

**NADA:** N-araquidonoil dopamina.

**NAGly:** N-araquidonoil glicina.

**NAPE-PLD:** N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D.

**N-ArPE:** N-araquidonoilfosfatidiletanolamina.

**NAT:** N-acil transferasa dependiente de calcio.

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso.

**NIH:** *National Institutes of Health*.

**NMDA:** Ácido N-metil-D-aspártico.

**NO:** Óxido nítrico.

**N/OFG:** Nociceptina / Orfanina FQ (F de fenilalanina y Q de glutamina).

**cNOS (iNOS):** Óxido nítrico sintasa constitutiva (subtipo inducible de NOS).

**NST:** Nocistatina.

**NTS:** Núcleo del tracto solitario.

**ODA:** Cis-9,10-octadecanoamida. Oleamida.

**OEA:** Oleiletanolamina.

**ORL-1:** *Opioid-like receptor 1*.

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**qRT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retrotranscripción.

**PE:** Fosfatidiletanolamina.

**PEA:** Palmitoiletanolamida.

**PENK:** Proencefalina.

**PFC:** Corteza Prefrontal.

**PKB:** Proteína kinasa B.

**PLC:** Fosfolipasa C.

**PLD:** Fosfolipasa D.

**POMC:** Proopiomelanocortina.

**PPARs:** Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

**PPNOC:** Prepronociceptina.

**PVC:** Cloruro de polivinilo.

**RIA:** Radioinmunoensayo.

**RIN:** *RNA integrity number*.

**RF1:** Razón fija 1.

**Ro 64-6198:** (1S,3aS)-8-(2,3,3a,4,5,6-Hexahydro-1H-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4 one.

**SEA:** Estearoiletanolamida.

**SN:** Sustancia negra.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SSC:** *Side scatter channel.*

**Ta:** *Annealing temperature.*

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

**TH:** Tirosina hidroxilasa.

**Th1:** Linfocito T colaborador (*helper*) tipo 1.

**$\Delta^9$ -THC // THC:**  $\Delta^9$  Tetrahidrocannabinol // Tetrahidrocannabinol.

**Thr:** Treonina.

**TLR4:** *Toll-like receptor 4.*

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.

**mTOR:** *Mammalian target of rapamycin.*

**Tris-HCl:** Trishidroximetilaminometano, con pH ajustado con ácido clorídrico.

**TRPV1:** Receptor de potencial transitorio de vanilloides tipo 1

**U-69593:** (+)-(5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\beta$ )-N-Methyl-N-[7-(1-pyrrolidiny)-1-oxaspiro[4,5]dec-8-yl)benzeneacetamide.

**WIN:** WIN 55, 212-2. Agonista cannabinoide sintético.

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

**Figura 1.** La planta *Cannabis Sativa*, de donde se extraen la marihuana y el hachís.

**Figura 2.** Principales endocannabinoides con sus fórmulas estructurales.

**Figura 3.** Esquema simplificado de la biosíntesis y degradación de los principales endocannabinoides

**Figura 4.** Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2.

**Figura 5.** Distribución de los receptores CB1 en sección sagital del cerebro de la rata, identificada mediante autorradiografía con el ligando radioactivo CP-55940 (ligando de alta afinidad).

**Figura 6.** Planta de la adormidera *Papaver Somniferum*

**Figura 7:** Esquema de los genes que codifican los péptidos opioides.

**Figura 8.** Vista general de la estructura del receptor  $\mu$  opioide

**Figura 9.** Sistema de autoadministración intravenosa de drogas (Med-Associates).

**Figura 10:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Cerebro anterior).

**Figura 11:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Núcleos Septales).

**Figura 12:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Hipocampo).

**Figura 13:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Mesencéfalo).

**Figura 14:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Colículos).

**Figura 15:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Zona del Núcleo Dorsal del Rafe).

**Figura 16:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Cerebelo).

**Figura 17:** Imágenes autorradiográficas representativas.

**Figura 18:** Expresión de los genes que codifican las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en ratas Lewis y Fischer 344 a nivel basal.

**Figura 19:** Relación entre la expresión de las enzimas de síntesis respecto a las de degradación de los principales endocannabinoides en el PFC y el NAcc en ratas Lewis y Fischer 344 a nivel basal.

**Figura 20:** Expresión de los genes que codifican los receptores CB1 y GPR55 en PFC y NAcc de ratas Lewis y Fischer 344 a nivel basal.

**Figura 21:** Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Lewis y Fischer 344.

**Figura 22.** Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Lewis y Fischer 344 (solo palanca activa).

**Figura 23:** Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 durante las 5 últimas sesiones de la fase de mantenimiento en ratas Lewis y Fischer 344.

**Figura 24:** Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Lewis.

**Figura 25:** Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Fischer 344.

**Figura 26:** Promedio de presiones de palanca activa e inactiva en las fases de adquisición y mantenimiento, en ratas LEW y F344.

**Figura 27:** Conducta de autoadministración de morfina y su extinción en ratas Lewis y Fischer 344.

**Figura 28:** Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (NAPE) y degradación (FAAH) de la AEA en el PFC.

**Figura 29:** Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (DAGL) y degradación (MAGL) del 2-AG en el PFC.

**Figura 30:** Expresión génica de los receptores de cannabinoides, CB1 y GPR55 en el PFC.

**Figura 31:** Relación entre las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en el PFC.

**Figura 32:** Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (NAPE) y degradación (FAAH) de la AEA en el NAcc.

**Figura 33:** Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (DAGL) y degradación (MAGL) del 2-AG en el NAcc.

**Figura 34:** Expresión génica de los receptores de cannabinoides, CB1 y GPR55 en el NAcc.

**Figura 35:** Relación entre las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en el NAcc.

**Figura 36:** Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (NAPE) y degradación (FAAH) de la AEA en esplenocitos.

**Figura 37:** Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (DAGL) y degradación (MAGL) del 2-AG en esplenocitos.

**Figura 38:** Expresión génica de los receptores de cannabinoides, CB2 y GPR55 en esplenocitos.

**Figura 39:** Relación entre las expresiones génicas de las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en esplenocitos.

## **Tablas**

**Tabla 1:** Los receptores opioides y sus ligandos endógenos y exógenos.

**Tabla 2:** Cebadores y sondas utilizados para estudiar la expresión génica basal.

**Tabla 3:** Cebadores utilizados para estudiar la expresión génica en los sujetos del experimento de autoadministración de morfina.

**Tablas 4 y 5:** Unión específica de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 a receptores de cannabinoides en distintas regiones cerebrales en ratas LEW y F344.

## RESUMEN

Los factores genéticos juegan un papel muy importante en la comprensión de los fenómenos adictivos. Existen diferentes aproximaciones experimentales para el estudio de estos factores en el contexto de las adicciones. Un modelo que se ha utilizado frecuentemente es el de las ratas histocompatibles Lewis (LEW) y Fischer 344 (F344). Estas cepas presentan claras diferencias en la autoadministración de diferentes drogas de abuso, y en la mayoría de los casos las ratas LEW muestran tasas de autoadministración mayores así como recaídas en el consumo más acusadas. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia del sistema endocannabinoide como modulador de procesos motivacionales y como factor crucial en las conductas adictivas. El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es estudiar el sistema endocannabinoide en las ratas LEW y F344 así como el refuerzo inducido por cannabinoides. En un primer grupo de experimentos investigamos las diferencias en la unión del ligando cannabinoide  $^3\text{H-CP 55,940}$  a sus receptores en diferentes áreas del encéfalo de ratas LEW y F344. Observamos que las ratas F344 mostraban mayores niveles de unión (y por tanto de receptores cannabinoides) en el globo pálido lateral. De manera complementaria, realizamos un análisis de expresión génica de diferentes elementos del sistema endocannabinoide en la corteza prefrontal (PFC) y el núcleo accumbens (NAcc) de ratas LEW y F344 y encontramos indicios de mayores niveles de anandamida (AEA) (a través del ratio NAPE-PLD/FAAH) en la PFC y NAcc de las ratas F344. En la PFC de estos animales también obtuvimos menores niveles de expresión génica del receptor cannabinoide CB1. Para comprobar la implicación funcional de estos resultados, analizamos la conducta de autoadministración del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) en ambas cepas, el efecto del bloqueo farmacológico del receptor CB1 sobre tal conducta, y su extinción. No se observaron diferencias entre razas en la autoadministración de WIN, pero las ratas F344 (no así las LEW) disminuyeron la tasa de presiones de palanca activa tras la administración del antagonista CB1 AM-251. No hubo diferencias durante la extinción de la autoadministración de WIN entre ambas cepas. Dado que existe una regulación cruzada entre los sistemas opioide y cannabinoide endógenos y dado que sabíamos que la autoadministración de morfina es marcadamente distinta en ambas cepas, quisimos observar el efecto que tenía la autoadministración de esta droga sobre la expresión génica de los elementos del sistema endocannabinoide citados anteriormente. Además, teniendo en cuenta que cada vez se atribuye un papel más importante al sistema inmune en la regulación de los procesos motivacionales, nos propusimos estudiar si la autoadministración de morfina o su extinción eran capaces de modular el sistema endocannabinoide en uno de los órganos inmunes por excelencia, el bazo. A nivel cerebral, no encontramos efectos claros de la autoadministración de morfina sobre los elementos del sistema endocannabinoide estudiados, aunque sí reproducimos los efectos derivados de la cepa que habíamos observado a nivel basal. Sin embargo, en el bazo sí obtuvimos evidencia indirecta que parece indicar una alteración de los niveles del endocannabinoide 2-araquidonilglicerol (2-AG) tras 15 días de extinción de la autoadministración de morfina, aunque este efecto fue similar en las ratas LEW y F344. Estos resultados sugieren que el sistema endocannabinoide podría ser una pieza más del puzzle genético que explique las diferencias individuales en los efectos reforzantes de la morfina y otras drogas de abuso y por otro lado nos indican que a pesar de lo que se creía en un principio, la autoadministración de morfina no tiene efectos notables sobre la expresión génica de los principales componentes del sistema endocannabinoide. Por último, esta tesis doctoral indica que la implicación del sistema endocannabinoide también se observa a nivel inmune y que la extinción de la autoadministración de morfina podría alterar los niveles de mensajeros endocannabinoides en el bazo, lo cual podría contribuir a explicar las alteraciones inmunológicas observadas en adictos a opiáceos.



## 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 El sistema endocannabinoide

El punto de partida de la investigación en el campo de los cannabinoides puede situarse en el año 1964, cuando los investigadores Gaoni y Mechoulam realizaron el aislamiento y síntesis química del principio activo de la *Cannabis Sativa* (Figura 1), el  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964). En un primer momento, se pensó que, debido a su alta liposolubilidad, el THC interactuaba directamente con la membrana celular, pero 24 años más tarde, el descubrimiento de un receptor de membrana específico para cannabinoides (Devane et al., 1988) pone de manifiesto la existencia de un sistema cannabinoide endógeno. Desde entonces



**Figura 1.** La planta *Cannabis Sativa*, de donde se extraen la marihuana y el hachís.

hasta hoy, el estudio del sistema endocannabinoide ha sido uno de los campos de la neurociencia más fructífero en lo que a creación de literatura científica se refiere, dejando patente las importantes implicaciones de los cannabinoides en la comprensión de la funcionalidad del sistema nervioso central y en la expresión de la conducta.

Actualmente sabemos que el sistema cannabinoide endógeno está íntimamente relacionado y modula la expresión de otros sistemas de neurotransmisión esenciales para la comprensión de los sustratos neuronales que dirigen, entre otras, las conductas de adicción a sustancias de abuso, como son el sistema opioide, el dopaminérgico, el serotoninérgico, el noradrenérgico, el colinérgico, el glutamatérgico y el GABAérgico.

El sistema endocannabinoide comprende a los endocannabinoides propiamente dichos, los receptores de membrana sobre los que actúa, un sistema de

recaptación (aunque actualmente no ha conseguido clonarse el recaptador de endocannabinoides) y las enzimas necesarias para su síntesis y degradación.

### 1.1.1. Endocannabinoides

El primer ligando endógeno para el entonces único receptor de cannabinoides conocido fue aislado en cerebro de cerdo en 1992 (Devane et al., 1992) y se le denominó anandamida (del sánscrito *ananda* que quiere decir “felicidad interior”). Se encontró que la anandamida (N-araquidonoiletanolamina, AEA) tenía propiedades fisiológicas y farmacológicas similares a los fitocannabinoides y a los cannabinoides sintéticos descubiertos en aquel momento, produciendo analgesia, depresión motora, catalepsia e hipotermia.

Pocos años después, se descubrió que el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), un intermediario en varias rutas de señalización bioquímica intracelular, también interactuaba con los receptores de cannabinoides, constituyéndose desde entonces en el segundo endocannabinoide (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Recientemente, varios compuestos endógenos con capacidad para unirse a los receptores de cannabinoides, y por tanto, postulados como endocannabinoides, han sido descubiertos (Figura 2): 2-araquidonilgliceril éter (noladin eter) (Hanus et al., 2001), O-araquidonoiletanolamina (virodhamina) (Porter et al., 2002), N-araquidonoil dopamina (NADA) (Huang et al., 2002), N-araquidonoil glicina (NAGly) (Huang et al., 2001), Cis-9,10-octadecanoamide (oleamida, ODA) (Leggett et al., 2004) y N-oleoildopamina (Pertwee et al., 2008). Estos compuestos son amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de los cuales, la AEA y el 2-AG son los mejor caracterizados conociéndose bien su farmacología y metabolismo. De los endocannabinoides de reciente descubrimiento se desconoce aún su relevancia fisiológica.

Para confirmar la complejidad del sistema endocannabinoide, mencionaremos la existencia de otros lípidos endógenos estrechamente relacionados con los endocannabinoides, que aunque no se unen a los receptores de cannabinoides, presentan actividades biológicas similares y comparten algunas rutas metabólicas. Estos compuestos, denominados cannabimiméticos (endocannabinoid-like compounds) pueden actuar modulando indirectamente la acción de los endocannabinoides por efecto “séquito” (“entourage” effects) (Lambert and Di Marzo, 1999). Dentro de este grupo podemos citar la palmitoiletanolamida (PEA), con efectos analgésicos y antiinflamatorios, la estearoiletanolamida (SEA), con efectos anorexígenos y la oleiletanolamina (OEA) implicada en la regulación del balance energético (Bisogno, 2008).

#### ANANDAMIDA

Este eicosanoide endógeno, al igual que el resto de endocannabinoides, es sintetizado a partir de precursores lipídicos de membrana como respuesta a un incremento en la concentración intracelular de calcio, producida por una despolarización o tras activación de un receptor metabotrópico acoplado a Gq/11, lo que sugiere que se producen en momentos de intensa actividad del Sistema Nervioso Central (Mackie, 2006). En este sentido, los endocannabinoides actúan de manera similar a otros moduladores, como prostaglandinas y leucotrienos, y diferente a los neurotransmisores clásicos que son almacenados en vesículas antes de su liberación.

Se ha comprobado que la AEA es un importante modulador de múltiples funciones fisiológicas en el sistema nervioso central y autónomo, en el sistema inmune, en la red endocrina, en el tracto gastrointestinal y en el sistema reproductor (Taylor et al., 2010; Battista et al., 2012). Entre sus principales efectos destaca la producción de analgesia, el control de la actividad motora, la reducción de la emesis, la estimulación del apetito, la inducción de hipotermia y su capacidad antiproliferativa

en células tumorales (Sarker et al., 2000; Maccarrone et al., 2000; Contassot et al., 2004).

En cuanto a su afinidad por los receptores de cannabinoides, podríamos decir que se comporta de manera inusual como ligando endógeno, ya que se muestra como un agonista parcial de CB1 y CB2, siendo su eficacia y afinidad, al igual que el THC, más bajas para CB2 que para CB1 (Pertwee et al., 2010).

La investigación reciente demuestra que las interacciones de los endocannabinoides sobre otros sistemas son más complejas de lo que se suponía en un principio. Se ha comprobado en astrocitos y en ratones knock-out que algunos de los efectos de la AEA no se producen a través de su acción sobre los receptores CB1 y CB2 (Breivogel et al., 2001; Monory et al., 2002). Hoy sabemos que la AEA también actúa sobre receptores de potencial transitorio de vanilloides tipo 1 (TRPV1), pudiendo actuar como un “endovanilloide” (Di Marzo et al., 2001; Starowicz et al., 2012), y que algunos de los efectos biológicos provocados por la AEA, incluyendo su efecto antiinflamatorio, la regulación de la conducta de ingesta y la analgesia, son debidos, al menos en parte, a su acción directa sobre los receptores nucleares de la familia de receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs) (O’Sullivan et al., 2007).

El hecho de que los endocannabinoides sean sintetizados “a demanda” y no se almacenen en vesículas, hace que sus niveles sean bajos en todos los tejidos en los que se expresan. Además, los niveles de estos endoligandos varían en respuesta a diferentes estímulos, en los distintos estadios del desarrollo y en diversas situaciones patológicas (Di Marzo et al., 2007). Aún así, en humanos se ha detectado AEA en el sistema nervioso central, en bazo, en corazón, en testículos, en útero y en células del endotelio vascular (Felder et al., 1996; Randall, 2007). A pesar de su amplia distribución anatómica, su baja concentración en fluidos corporales, plasma, suero y líquido cefalorraquídeo apoya la idea de que este endoligando actúa localmente, produciéndose cerca de sus lugares de acción. Su distribución en cerebro, coincide de

manera general con las áreas de distribución del receptor CB1, siendo su concentración mayor en las áreas en las que el CB1 es más abundante (Felder et al., 1996; Bisogno et al., 1999), exceptuando el tálamo y el tronco del encéfalo, regiones en las que se rompe este paralelismo. Algunos autores explican estas excepciones proponiendo la existencia de otros endocannabinoides aún por identificar o acudiendo a la diferencia en la eficacia de la activación de los receptores según la región cerebral en la que se expresan (Breivogel et al., 1997).

## 2-ARAQUIDONOILGLICEROL (2-AG)

Este segundo endocannabinoide, formado por ácido araquidónico y glicerol unidos por un enlace tipo éster, es también sintetizado “a demanda” a partir de precursores lipídicos de membrana como respuesta a una elevación de las concentraciones intracelulares de calcio. A pesar de su similitud química y funcional con la AEA, el 2-AG difiere del primer endocannabinoide al mostrarse como agonista total de los receptores CB1 y CB2. Esta capacidad de activación de los receptores cannabinoides unida al hecho de que en cerebro y en tejidos reproductivos presenta una concentración unas 200 veces mayor que la AEA, hace proponer a algunos autores que este compuesto sea el verdadero agonista endógeno de los receptores de cannabinoides (Sugiura et al., 2006; Fonseca et al., 2010). Se sabe que también actúa sobre los receptores nucleares de la familia de PPARs, concretamente sobre el PPAR $\gamma$  (Du et al., 2011), pero se piensa, al contrario que la AEA, que no actúa sobre el TRPV1.

Se ha detectado la presencia de 2-AG en cerebro, intestino, páncreas, bazo, hígado, pulmón, riñón y corazón (Mechoulam et al., 1995; Bisogno et al., 1999; Sugiura et al., 2002; Pacher et al., 2006).

## OTROS POSIBLES ENDOCANNABINOIDES

Incluimos en este apartado aquellas sustancias endógenas de características similares a los dos endocannabinoides ya comentados, que tienen capacidad de unirse a los receptores de cannabinoides.

### 2-araquidonilgliceril éter (noladin eter)

Es un análogo del 2-AG que fue aislado por primera vez en extracto lipídico de cerebro de cerdo (Hanus et al., 2001). Aunque su concentración en cerebro es demasiado baja para poder considerarlo como un verdadero ligando endógeno (Oka et al., 2003), su estructura química de éter, generalmente estable en vivo, le hace tener mayor estabilidad que los dos principales endocannabinoides, ya que las amidas (AEA) y los ésteres (2-AG) son rápidamente hidrolizados en vivo (Mechoulam et al., 1998). Aunque la mayoría de estudios indican que se une a CB1 y muy débilmente a CB2 (Hanus et al., 2001), algunos estudios han mostrado que en cultivos de células humanas puede actuar como agonista completo CB2 (Shoemaker et al., 2005) y que inhibe la activación del receptor  $\mu$ -opioides a través de su acción sobre el CB2 (Paldyova et al., 2008).

### O-araquidonoiletanolamina (virodhamina)

El éster de ácido araquidónico y etanolamina puede actuar como agonista parcial CB1 y antagonista a dosis elevadas, y como agonista completo CB2 (Porter et al., 2002). Se ha descrito su presencia en tejido cerebral, pero se cree que es rápidamente transformado en AEA (Porter et al., 2002). Su presencia en tejidos periféricos, especialmente donde se expresa CB2, es más alta que la de AEA, lo que apoya su papel como agonista completo CB2 (Porter et al., 2002). La virodhamina relaja el tejido mesentérico de rata (Ho et al., 2004), y la arteria pulmonar en humanos (Kozłowska et al., 2008) a través del probable receptor endotelial de cannabinoides, activa el receptor nuclear PPAR $\alpha$  (Sun et al., 2006) y el candidato a receptor de cannabinoides GPR55 (Sharir et al., 2012).

#### N-araquidonoil dopamina (NADA)

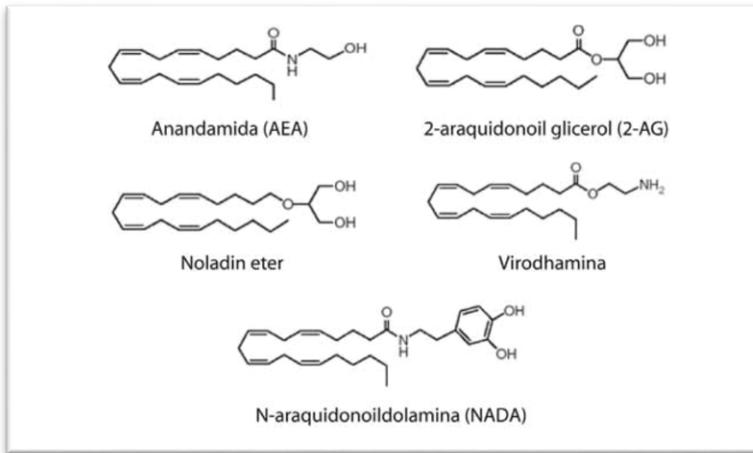
Es un ligando endógeno que puede actuar como endovanilloide o endocannabinoide según se una a TRPV1 o a CB1 respectivamente (Huang et al., 2002; Bisogno et al., 2000). También se ha descrito que es capaz de activar el receptor nuclear PPAR $\gamma$  ( O'Sullivan, 2007).

#### N-araquidonoil glicina (NAGly)

Este lipoaminoácido fue sintetizado por primera vez como parte de los estudios de estructura-actividad de compuestos que se unían a CB1 (Sheskin et al., 1997). Se tiene constancia de la presencia de NAGly en tejido cerebral, médula espinal, intestino, riñón, sangre y piel (Huang et al., 2001). Se ha descrito su capacidad inhibitoria sobre la actividad de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), principal encima responsable de la degradación de AEA, proponiéndolo como regulador fisiológico de los niveles de AEA en los tejidos (Huang et al., 2001; Burstein et al., 2002; Grazia Cascio et al., 2004). Están documentadas sus propiedades analgésicas (Huang et al., 2001; Vuong et al., 2008; Barbara et al., 2009; Jeong et al., 2010) y antiinflamatorias (Burstein et al., 2011), vasorrelajantes (Parmar et al., 2010), así como su capacidad para inhibir la función de los canales de calcio (Ross et al., 2009).

#### Cis-9,10-octadecanoamida (oleamida, ODA)

Esta amida de ácido graso fue aislada por primera vez de líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño, por lo que en un primer momento se pensó que era una sustancia con capacidad de inducir somnolencia (Cravatt et al., 1995). Al igual que NAGly, comparte con la AEA su principal enzima de degradación, por lo que podría modular la actividad de la AEA por efecto "séquito" ("entourage effects"). Además se ha demostrado que actúa como agonista completo de CB1 (Leggett et al., 2004).



### 1.1.2. Biosíntesis, liberación, recaptación y degradación de los endocannabinoides

Los

endocannabinoides

modulan respuestas

fisiológicas actuando sobre

otros sistemas de

neurotransmisión y su

**Figura 2.** Principales endocannabinoides con sus fórmulas estructurales. Puede apreciarse el esqueleto de veinte carbonos y los radicales correspondientes.

actuación debe ser estrechamente controlada con mecanismos que permitan sintetizarlos e inactivarlos rápidamente. Teniendo en cuenta su amplia distribución en el organismo y la variedad de tejidos en los que se expresan, es posible que existan particularidades en su metabolismo dependientes del tipo celular sobre el que estén actuando (Rakhshan et al., 2000). También conocemos estudios recientes en los que se ha encontrado evidencia que rompe el consenso que establecía que los endocannabinoides eran sintetizados “a demanda”, al encontrarse AEA en el interior celular almacenada en adiposomas (Oddi et al., 2008). En este apartado comentaremos los conocimientos actuales sobre el tema que nos atañe centrándonos en los dos principales endocannabinoides, AEA y 2-AG, en tejido neuronal, que es donde parece haber mayor acuerdo en la comunidad científica.

### BIOSÍNTESIS

A día de hoy no se ha descrito un mecanismo realmente eficiente que explique la biosíntesis de los principales endocannabinoides. La AEA se puede sintetizar a partir de ácido araquidónico (AA) y etanolamina gracias a la catalización enzimática de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Ueda et al., 1995). Esta vía, sin embargo, puede que no tenga relevancia fisiológica pues necesita concentraciones demasiado

elevadas de los sustratos (Okamoto et al., 2007). Parece mucho más probable que la AEA se sintetice por hidrólisis de la fosfatidiletanolamina (PE), un fosfolípido abundante en las membranas. Esta vía se desarrolla en dos pasos. En primer lugar, el O-araquidonoil fosfolípido transfiere un ácido graso al grupo amino de la PE por acción de la N-acil transferasa dependiente de calcio (NAT) para formar el precursor N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (N-ArPE). En segundo lugar se hidroliza N-ArPE, liberándose ácido fosfatídico y AEA, por la acción catalítica de la NAPE-PLD, una fosfolipasa D dependiente de calcio (Jin et al., 2007; Okamoto et al., 2007). La NAPE-PLD es constitutivamente activa, por lo que la etapa limitante de esta síntesis debe ser la primera. La AEA comparte esta ruta con la N-palmitoiletanolamina, la N-oleoiletanolamina (OEA) y la N-estearoiletanolamina, N-aciletanolaminas con propiedades cannabimiméticas analgésicas y antiinflamatorias, y su síntesis suele realizarse conjuntamente con ellas (Dalle Carbonare et al., 2008). Esta ruta de síntesis, aunque comúnmente aceptada, tampoco parece ser muy eficiente ya que los niveles del precursor N-ArPE encontrados en el cerebro son excesivamente bajos.

A partir del precursor N-ArPE, la AEA puede sintetizarse siguiendo otras dos vías. Una consistiría en la hidrólisis del precursor por una fosfolipasa C para formar fosfoAEA y su posterior desfosforilación por fosfatasas (Liu et al., 2008) y la otra en una doble desacilación de N-ArPE por una hidrolasa (ABH4) (Simon et al., 2006) y la posterior hidrólisis del glicerofosfo N-ArPE para dar AEA y glicerol-P (Liu et al., 2008).

La biosíntesis del 2-AG se produce a partir del diacilglicerol (DAG), un mediador lipídico habitual en las células, por la acción de dos diacilglicerol lipasas (DAGL $\alpha$  y DAGL $\beta$ ), enzimas localizadas en la membrana plasmática y que son estimuladas por el aumento de calcio intracelular (Bisogno, 2008). Recientemente se ha sugerido que debe existir otra vía de síntesis de 2-AG que sería responsable de mantener los niveles basales de este mediador (Wettschureck et al., 2006).

## LIBERACIÓN Y RECAPTACIÓN

Una vez sintetizados en el interior de la célula, los endocannabinoides deben salir al espacio extracelular para acoplarse a los receptores CB1 y CB2 presentes en el exterior de la membrana plasmática de las células sobre las que deben actuar, y después de activar los receptores, deben pasar de nuevo al interior celular dónde son degradados por hidrólisis u oxidación. Ambos procesos, liberación y recaptación, debido a la naturaleza lipofílica de los endocannabinoides, pueden realizarse por difusión pasiva. De este modo, la dirección que sigan los endocannabinoides, hacia el exterior o hacia el interior celular, dependerá de la concentración de estas sustancias en ambos espacios, ya que la difusión pasiva se realiza siempre a favor de gradiente, y por consiguiente, la recaptación dependerá de la actividad de las enzimas responsables de su degradación (Glaser et al., 2003; Kaczocha et al., 2006; Deutsch et al., 2001). Recientemente han sido identificadas un tipo de proteínas intracelulares encargadas de “secuestrar” a la AEA y transportarla a los diferentes compartimentos celulares. Las AIBP (*anandamide intracellular binding proteins*) pueden participar en la creación del gradiente de concentración necesario para la recaptación de la AEA retirándola del citosol y almacenándola en adiposomas (Kaczocha et al., 2009; Oddi et al., 2009) donde pueden acumularse y degradarse, pues hay constancia de la presencia de las enzimas que la degradan en estas estructuras intracelulares (Maccarrone et al., 2010).

A pesar de lo comentado hasta ahora, la recaptación de AEA es un proceso que ocurre rápidamente, es dependiente de temperatura, saturable y con especificidad por el sustrato, lo que apoya la existencia de una proteína de membrana encargada de su transporte (Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997). De hecho, la difusión facilitada por un transportador específico de membrana es el mecanismo comúnmente aceptado por la comunidad científica para explicar la recaptación de endocannabinoides. La EMT (*endocannabinoids membrane transporter*), aunque aún no ha podido ser clonada, ha sido descrita y parcialmente caracterizada. Este

transportador trabaja con los dos principales endocannabinoides, AEA y 2-AG, facilitándoles atravesar la membrana plasmática en ambas direcciones, participando así tanto en su liberación como en su recaptación.

Recientemente, ha sido descrita otra proteína que podría participar en la recaptación de la AEA. Se trataría de una variable truncada una amido hidrolasa de ácidos grasos que se expresa en células neurales, la FAAH-1, que habría perdido su capacidad para actuar como amidasa y a la que se ha denominado FLAT (*FAAH-1 like anandamide transporter*) (Fu et al., 2012).

También se postula que los endocannabinoides podrían ser recaptados a través de una endocitosis rápida tras su concentración en balsas lipídicas (lipid rafts) ricas en caveolina (Danise et al., 2007).

Aunque en el estudio del sistema endocannabinoide cuanto más se avanza más evidente se hace su gran complejidad, esperamos que pronto se resuelvan las dudas sobre los mecanismos responsables de su liberación y recaptación.

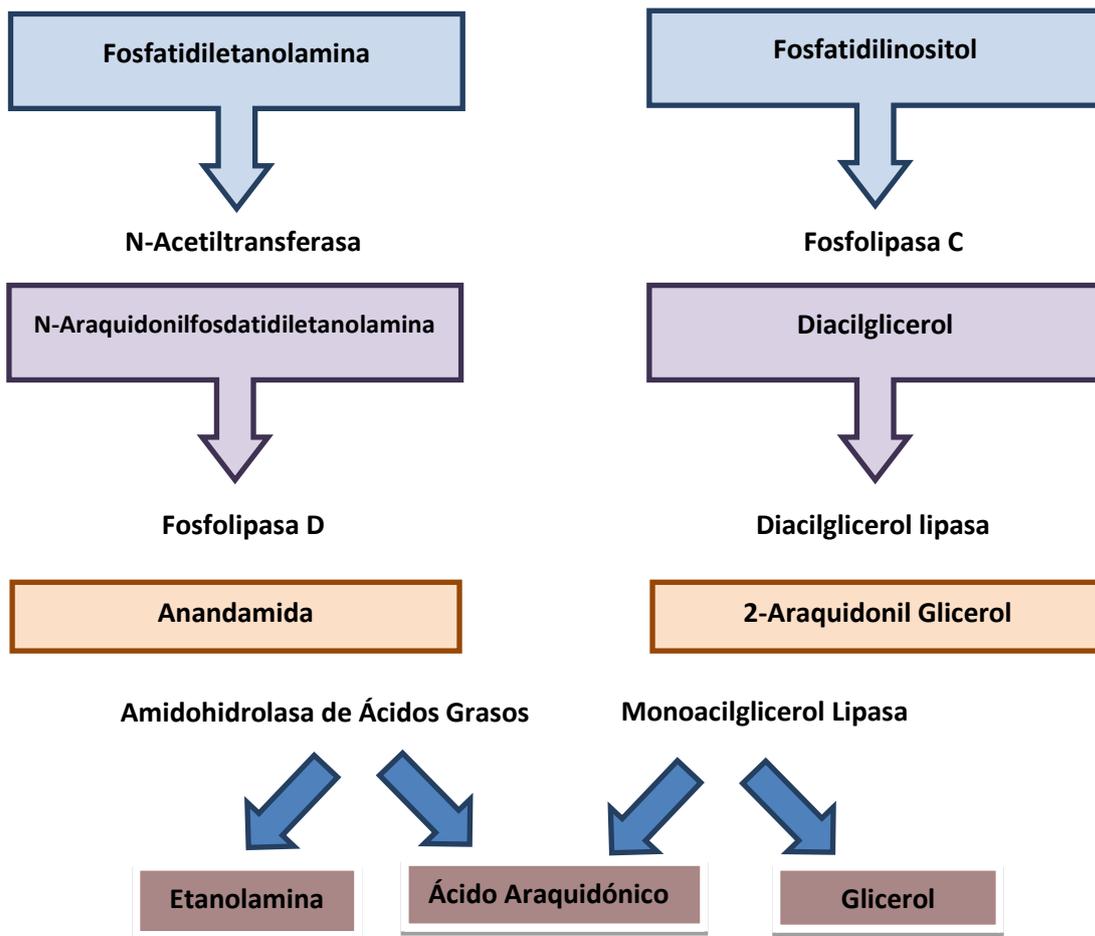
## DEGRADACIÓN

Los endocannabinoides una vez recaptados y en el interior de la célula, deben ser degradados para que sus componentes puedan ser reutilizados en la síntesis de nuevos endocannabinoides o transformados en metabolitos que puedan tener actividad biológica interviniendo de esta forma en la homeostasis celular (Figura 3).

Una vez en el interior celular, la AEA es degradada por hidrólisis a etanolamida y ácido araquidónico por acción de una FAAH, la cual puede también hidrolizar el 2-AG, la oleamida y otras amidas de ácidos grasos (Labar y Michaux, 2007). Recientemente se ha clonado otra enzima, la NAAA (*N-Acylethanolamine-Hydrolyzing Acid Amidase*), presente en lisosomas, que puede catalizar la misma reacción que FAAH aunque no presenta en su secuencia homología con ella. Parece ser que NAAA presenta una reactividad más alta por PEA que por AEA (Tsuboi et al., 2007).

El 2-AG es principalmente hidrolizado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) a glicerol y ácido araquidónico. Los estudios han demostrado que en cerebro de ratón, aproximadamente un 85% del 2-AG es hidrolizado por acción de esta enzima (Blankman et al., 2007; Saario et al., 2005). Aún así, confirmando la complejidad del sistema endocannabinoide, otras enzimas parecen estar involucradas en la catálisis del 2-AG. Se ha encontrado evidencia *in vitro* de la participación en este proceso de dos proteínas integrales de membrana pertenecientes a la familia de las ABHD ( $\alpha$ ,  $\beta$ , *hydrolase domain containing*). Concretamente la ABHD<sub>6</sub> y la ABHD<sub>12</sub>, con la zona catalítica intra y extracelular respectivamente, participan en la hidrólisis del principal endocannabinoide (Blankman et al., 2007; Navia-Paldanius et al., 2012).

El ácido araquidónico obtenido por la hidrólisis de los endocannabinoides puede constituirse en el sustrato de otras enzimas y transformarse en diversos compuestos para cumplir múltiples funciones biológicas. Además, la AEA y el 2-AG pueden ser metabolizados por la acción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y por diversas lipooxigenasas (Kozak et al., 2002). Estos metabolitos oxidativos pueden realizar diversas funciones biológicas, complicando enormemente la comprensión del funcionamiento del intrincado sistema endocannabinoide. Se tiene constancia, por ejemplo, de que algunos metabolitos oxidativos del 2-AG pueden inhibir la acción de FAAH, controlando de este modo la degradación de la AEA (Maccarrone et al., 2000; van der Stelt et al., 2002).



**Figura 3.** Esquema simplificado de la biosíntesis y degradación de los principales endocannabinoides.

### 1.1.3. Receptores de cannabinoides

#### DESCUBRIMIENTO

En los años 70 se hablaba ya de la existencia de un sitio de unión específico para cannabinoides que sería el responsable de los efectos mediados por el  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (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 (Harris et al., 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 et al., 1985), mediante un mecanismo similar al descrito para los anestésicos generales (Martin et al., 1976c). No fue hasta el año 1988 cuando se caracterizó el primer receptor para cannabinoides, el CB1 (Devane et al., 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

En 1990 se consiguió la clonación del receptor CB1 a partir de una “biblioteca” de cADN de córtex de rata (Matsuda et al., 1990). Sólo un año más tarde se caracterizaría también el receptor CB1 en humanos a partir de muestras del tronco cerebral (Gerard et al., 1991) y algo después en ratón (Akinshola et al., 1999). 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 1993 fue caracterizado el otro gran tipo de receptor cannabinoide, el CB2, a partir de células mieloides de bazo de rata (Munro et al., 1993). En 1999 se describió un grupo de tres nuevos receptores acoplados a proteína G (Sawzdargo et al., 1999), de entre los cuales, el GPR55 parece que según ciertos autores, podría ser considerado como un tercer receptor cannabinoide implicado en el incremento del calcio intracelular, ya que es activado por agonistas cannabinoides y bloqueado por sus antagonistas (Lauckner et al., 2008; Pertwee, 2007; Ryberg et al., 2007).

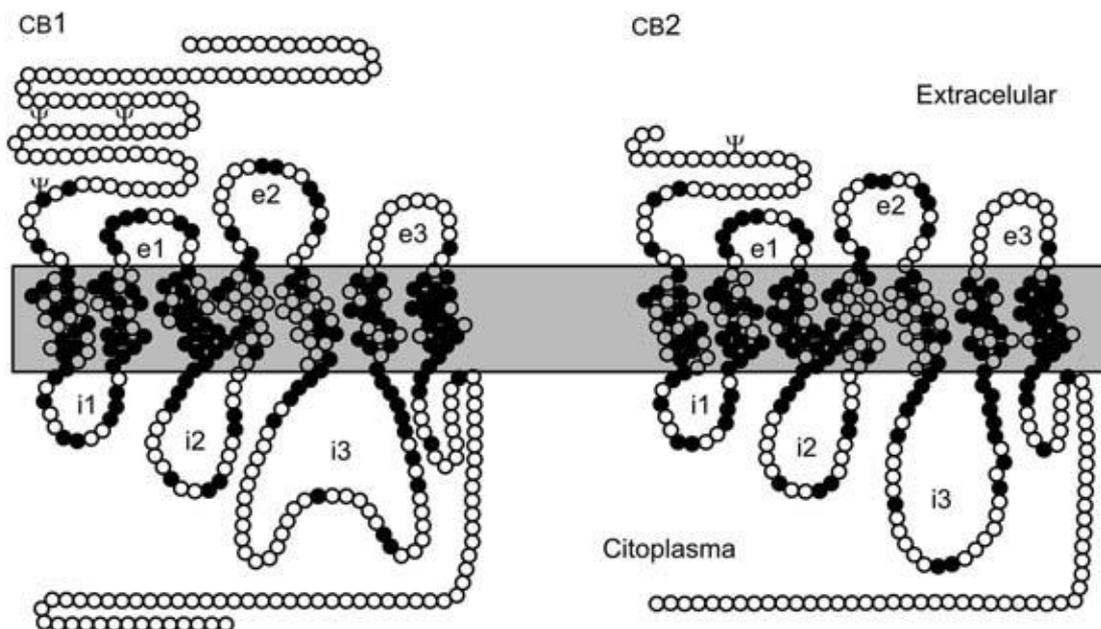
Revisaremos a continuación las principales características moleculares de los dos principales receptores cannabinoides:

### Receptor CB1

La ubicación genética del locus para este receptor en humanos está en el cromosoma 6, concretamente en la posición 6q14-6q15. Está constituido por 472 (humanos)-473 (ratas/ratones) 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 cannabinoides 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 (Figura 4) (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 (Bossong et al., 2008). También ha sido descubierto que a la altura del tercer bucle intracelular es donde el receptor cannabinode podría interaccionar con las proteínas Gi/o (Howlett et al., 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 (Figura 4) (Mukherjee et al., 2004). Su estructura tridimensional responde a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, al igual que CB1.



**Figura 4. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2.** Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. (Círculos negros) Aminoácidos comunes a los dos receptores; (círculos vacíos) aminoácidos diferentes; ( $\psi$ ) sitios consenso de glicosilación. (**e1, e2, e3**) son asas extracelulares; (**i1, i2, i3**) son asas intracelulares

## 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 et al., 1990; Herkenham et al., 1991; Lynn y Herkenham, 1994; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou et al., 1998) como en el hombre (Westlake et al., 1994). No obstante, parece ser que en el sistema nervioso central también hay presencia de receptores CB2, aunque de manera mucho más restringida (Brusco, Tagliaferro, Saez, & Onaivi, 2008; den Boon et al., 2012; Van Sickle et al., 2005; Zhang et al., 2014).

Los primeros estudios que permitieron mapear la distribución del receptor CB1 en el sistema nervioso central se realizaron utilizando técnicas de autorradiografía, usando el  $^3\text{H}$ -CP 55,940 como ligando radiactivo (Figura 5) (Herkenham et al., 1990;

Herkenham et al., 1991). Además de este ligando, posteriormente se han utilizado otros como el SR141716A (Terranova 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 VI de la corteza.

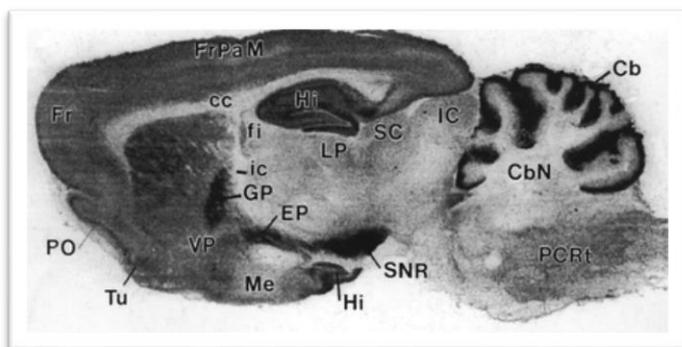
-Nivel de expresión media: En el pallidum ventral y NAcc.

-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 tejidos periféricos. Así, este receptor puede hallarse en adenohipófisis (Gonzalez et al., 1999), bazo, amígdalas, hígado, corazón, útero, ovario, próstata, testículos (Christopoulos et al., 2001; Pertwee, 2001a; Ross et al., 2001) y sistema inmune (en esplenocitos, linfocitos T4 y T8, células NK...) (Daaka et al., 1995; Kaminski et al., 1992; Rinaldi-Carmona et al., 1998). También han sido encontrados receptores CB1 en algunos terminales nerviosos periféricos a nivel presináptico (Galiegue et al., 1995; Ishac et al., 1996), en la retina (Porcella et al., 2000) e incluso en otro tipo de células nerviosas: astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Cabral et al., 2001; Molina-Holgado et al., 2002; Sanchez et al., 1998). Se sabe, además, por medio de técnicas inmunohistoquímicas 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), aunque algunos estudios electrofisiológicos sugieren también una localización postsináptica (Ronesi y Lovinger, 2005).

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 y Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 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 para su síntesis se encuentra, *a priori*, 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 y Herkenham, 1994; Schatz et al., 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 (Ahluwalia et al., 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 (Akinshola et al., 1999; Gong et al., 2006).

**Figura 5. Distribución de los receptores CB1 en sección sagital del cerebro de la rata, identificada mediante autorradiografía con el ligando radioactivo CP-55940 (ligando de alta afinidad):** Cb = cerebelo; CbN = núcleo cerebela profundo; cc = cuerpo calloso; EP = núcleo entopeduncular; fi = fimbria hipocampo; Fr = cortex frontal; FrPaM = córtex frontoparietal área motora; GP = globo pálido; Hi = hipocampo; IC = colículo inferior; LP = tálamo lateral posterior; Me = núcleo amigdalino medial; PO = córtex olfativo primario; PCRt = núcleo reticular parvocelular; SNR = *substantia nigra* reticulada; Tu = tubérculo olfatorio; VP = tálamo ventroposterior. Foto del Dr Miles Herkenham, National Institute of Mental Health, EE.UU.

## 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 et al., 1991).

-Cerebelo y ganglios basales: El sistema endocannabinoide que aparece aquí explicaría los efectos sobre la actividad motora (Glass y 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 (Romero et al., 1998b), el dopaminérgico (Fernandez-Ruiz et al., 2002; Fernandez-Ruiz y Gonzales, 2005), 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 y/o el dopaminérgico (Gardner, 2005; Tanda et al., 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 las funciones neuroendocrinas (Rodríguez de Fonseca et al., 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 et al., 1999).

-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). Este tema se desarrollará con más amplitud en el apartado sobre cannabinoides y sistema inmune.

## OTROS RECEPTORES DE CANNABINOIDES

A pesar de que actualmente sigue sin haber consenso sobre el supuesto tercer receptor de cannabinoides, existe amplia evidencia científica de que los endocannabinoides ejercen acciones sobre otros receptores distintos al CB1 y al CB2, aunque no sean sus principales ligandos. Así, se descubrió que la AEA era capaz de unirse a un tipo de canal catiónico activado por capsaicina, el receptor vanilloide VR1/TRPV1 (Sagar et al., 2004; Zygmunt et al., 1999), aumentando la entrada de calcio en la célula (Olah et al., 2001). También se sabe que la AEA puede bloquear un subtipo de canal de potasio, el TASK-1 (Maingret et al., 2001) y que el 2-AG puede activar los receptores nucleares PPARs (Du et al., 2011).

La probabilidad de que existan nuevos receptores, cuyos principales ligandos sean 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 et al., 2001). En experimentos similares con *knockout* se ha encontrado que los efectos de la AEA sobre la vasodilatación de la arteria mesentérica eran inhibidos por el antagonista SR141716A (Di Marzo et al., 2001). 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 et al., 1997). También se ha sugerido la presencia de un nuevo receptor sensible a la acción de los cannabinoides a nivel de la transmisión glutamatérgica del hipocampo (Hajos et al., 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 (Brown, 2007; Hiley y Kaup, 2007; Johns et al., 2007; Ledent et al., 1999; Pertwee, 2007; Ryberg et al., 2007) al cual, debido a la gran atención que ha levantado entre los investigadores de este campo y a que es un elemento central en las investigaciones de esta tesis, dedicamos un apartado en exclusiva.

## RECEPTOR GPR55

En 1999 se aisló por primera vez éste receptor en muestras de cerebro humano (Sawzdargo et al., 1999) encontrándose ámpliamente expresado en estriado, caudado y putamen. En este mismo estudio se identificó el gen que codifica esta proteína en el brazo largo del cromosoma 2, concretamente en la posición 2q37. El receptor GPR55 es una proteína de 319 aminoácidos perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G con 7 regiones transmembrana, cuya secuencia aminoacídica presenta la mayor homología con el receptor purinérgico P2Y5 (29%), con los receptores pseudopurinérgicos GPR23 (30%) y GPR35 (27%), y con el receptor de quimioquinas CCR4 (23%). En cuanto a su origen filogenético, los últimos estudios sugieren su origen en los cordados primitivos, ya que se han encontrado ortólogos en el pez globo, pez cebra, marsupiales, ratón, rata, perro, vaca y chimpancé (Baker et al., 2006; Ryberg et al., 2007; McPartland et al., 2007).

Diversos estudios con PCR han mostrado la presencia de la molécula de ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos del GPR55 en múltiples tejidos. Así, además de expresarse ámpliamente en tejido cerebral, se tiene constancia de su expresión en glándulas adrenales, intestino delgado, bazo, pulmón, corazón, músculo esquelético, hígado, páncreas, útero, vejiga, esófago, estómago, riñón, tejido adiposo, placenta y médula ósea (Howlett et al., 2002; Ryberg et al., 2007). En el sistema

nervioso se expresa, en orden decreciente, en corteza frontal, estriado (putamen, caudado y NAcc), hipotálamo, tallo cerebral, hipocampo, cerebelo y espina dorsal (Sawzdargo et al., 1999; Brown y Wise, 2001; Ryberg et al., 2007; Staton et al., 2008; Pietr et al., 2009). Ryberg y sus colaboradores, basándose en que los niveles de expresión del mensajero de GPR55 en el cuerpo estriado, en hipotálamo y en el tallo cerebral son comparables a los niveles de expresión del mensajero de CB1, sugieren un papel importante de esta proteína en aquellos procesos en los que estos núcleos cerebrales tengan una implicación central. Esto aporta mayor fundamento a nuestras investigaciones, ya que el estriado es un núcleo clave para explicar las bases neurales de las conductas relacionadas con la adicción.

Debido a su presencia prácticamente ubicua en las distintas regiones cerebrales, y al alto nivel de expresión de sus principales componentes (el receptor CB1 es el receptor acoplado a proteína G más abundante en el cerebro), desde hace algunos años existe amplio consenso en considerar al sistema endocannabinoide como el principal sistema de neuromodulación cerebral. Los estudios utilizando técnicas de bloqueo farmacológico y animales *knockout*, demostraron que los receptores CB1 y CB2 no explican todos los efectos que provocan los endocannabinoides, los fitocannabinoides y sus análogos sintéticos, y que debe existir, al menos, un tercer receptor de cannabinoides (Mackie y Stella, 2006; Brown, 2007). Los usos potenciales que se derivasen de la identificación de este tercer receptor de cannabinoides llevaron a la industria farmacéutica, concretamente a AstraZeneca y a GlaxoSmithKline, a afirmar en 2006, que el GPR55 era la molécula buscada (Baker et al., 2006). Sin embargo, la evidencia científica nos muestra una realidad mucho más compleja que indica que el GPR55 tiene una estrecha relación, y a varios niveles, con el sistema cannabinoide, pero no tan clara y exclusiva como para considerarlo el tercer receptor de este sistema.

Considerar los endocannabinoides como ligandos del GPR55 es un asunto controvertido. Diversos estudios analizando como efecto de la activación de este receptor la fosforilación de ERK o el aumento del calcio intracelular, han llegado a distintas conclusiones. Así, en algunos la conclusión es que ni la AEA ni el 2-AG tienen la capacidad de activar el receptor (Oka et al., 2009), en otros se concluye que ambos endocannabinoides se comportan como potentes agonistas del GPR55 (Ryberg et al., 2007) en otros que la AEA sí actúa como agonista mientras que el 2-AG no tiene efecto sobre éste receptor (Lauckner et al., 2008) y en otros que la virodhamina y la AEA pueden actuar sobre el GPR55 como agonistas parciales (Sharir et al., 2012).

En cuanto a los efectos que provocan sobre el GPR55 los fitocannabinoides y sus análogos sintéticos también existe controversia. Hay estudios que concluyen que el THC actúa como agonista del GPR55 (Ryberg et al., 2007; Lauckner et al., 2008), mientras que en otros no se encuentra que cause ningún efecto (Oka et al., 2007). Con el CBD, otro de los principales componentes de la marihuana aunque con baja afinidad por los receptores CB1, parece que hay mayor consenso sobre su condición de antagonista del GPR55 (Ryberg et al., 2007; Ross 2009). Sin embargo, su análogo sintético, el O-1602, parece actuar como agonista de este receptor (Ryberg et al., 2007; Johns et al., 2007; Waldeck-Weiermair et al., 2008; Oka et al., 2009). Al estudiar como influye el CBD-anómalo en nuestro receptor, volvemos a encontrar resultados dispares, estudios que lo caracterizan como agonista (Ryberg et al., 2007; Johns et al., 2007) y otros que no encuentran que cause ningún efecto (Lauckner et al., 2008). Hay investigadores que han llegado a considerar al GPR55 como un receptor “anticannabinoide” al encontrar que agonistas de los receptores de cannabinoides, como el CBD y el CP 55,940, actúan sobre él como antagonistas, y que antagonistas de los receptores de cannabinoides, como en Rimonabant y el AM251, actúan como agonistas del GPR55 (Kapur et al., 2009; Henstridge et al., 2009, 2010; Milligan 2011), pero existen estudios en los que encuentran que el CP 55,940 actúa como agonista

parcial (Kapur et al., 2009) y otros en donde el Rimonabant actúa como antagonista a concentraciones bajas (Lauckner et al., 2008). Por último comentaremos que el cannabinoide sintético WIN 55,212-2, un potente agonista de los receptores de cannabinoides, no parece actuar sobre el GPR55 (Ryberg et al., 2007; Lauckner et al., 2008).

Debemos tener en cuenta que los estudios sobre la farmacología del receptor GPR55 se encuentran aún en una fase incipiente y que la mayoría han sido realizados sobre cultivos celulares. Los resultados dispares pueden atribuirse a los distintos métodos usados para evaluar la actividad de los compuestos sobre el receptor y a que, probablemente, sean distintos dependiendo del ligando, de su concentración y del tejido en el que se exprese.

Poco después de que la industria farmacéutica lo considerase como el tercer receptor de cannabinoides, Oka y colaboradores demostraron que el auténtico receptor endógeno del GPR55 es el lisofosfatidilinositol (LPI) (Oka et al., 2007), y dos años más tarde, que de todas las combinaciones lipídicas que pueden formar el LPI, la que actúa como el agonista más potente del GPR55 es su isoforma 2-araquidonoil-LPI (Oka et al., 2009). Desde entonces, todos los estudios que han utilizado este fosfolípido han encontrado que actúa como potente agonista del GPR55, confirmando los postulados de Oka (Pertwee et al., 2010). Esto, por supuesto, no invalida los estudios en los que diversas sustancias cannabinoides actúan como agonistas o antagonistas del GPR55, sino que, por el contrario, añade un nuevo punto de conexión de este receptor con el sistema endocannabinoide, ya que, el LPI, aunque no ejerce ningún efecto sobre CB1 ni sobre CB2, mantiene una estrecha relación metabólica con el agonista endocannabinoide más ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, el 2-AG. Concretamente, existe evidencia científica de que el 2-araquidonoil-LPI puede ser degradado a 2-AG por la fosfolipasa C (PLC), y se postula que esta

reacción también puede darse en sentido inverso aunque se desconoce la enzima responsable (Pineiro y Falasca, 2012).

En cuanto a las cascadas de eventos moleculares que se producen como resultado de la activación del GPR55, tampoco parece fácil encontrar una opinión unánime. Hay evidencia de acoplamiento del GPR55 a proteína  $G_{\alpha 13}$  que activa la vía de señalización que involucra a RhoA y ROCK y a la fosfolipasa C para formar inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y liberar  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares (Ryberg et al., 2007; Henstridge et al., 2009; Balenga et al., 2011; Brown et al., 2011) , pero en otros estudios se ha encontrado acoplamiento del GPR55 a proteína  $G_{\alpha 12}$  y a  $G_{\alpha q}$  involucrando también a una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol y provocando igualmente una elevación del calcio intracelular (Lauckner et al., 2008). También hay evidencia de que en pasos posteriores de la cascada de señalización intracelular se provoca la fosforilación de ERK (Oka et al., 2007; Pietr et al., 2009; Henstridge et al., 2010; Piñeiro et al., 2011) y la activación de la MAPK p38 (Oka et al., 2010). De cualquier manera, la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular que provoca la activación del receptor GPR55 en las neuronas en las que se expresa, parece provocar la liberación de neurotransmisores (Sylantsev, Jensen, Ross, & Rusakov, 2013), lo que es especialmente relevante para nuestras investigaciones, teniendo en cuenta su estrecha relación con el sistema endocannabinoide, cuyos receptores, al activarse, provocan el efecto contrario, es decir, la inhibición de la neurotransmisión. Todo esto añade mayor fundamento para investigar la evolución conjunta de los receptores CB1 y GPR55 en nuestros experimentos.

## MECANISMOS INTRACELULARES DE TRANSDUCCIÓN

Puede afirmarse de manera general que los receptores cannabinoides pueden actuar a tres niveles diferentes tras su activación por un ligando selectivo: a través de la interacción de la proteína G con diferentes elementos intracelulares, principalmente

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  $G_i/o$  de tipo inhibitorio (Prather et al., 2000), aunque también se ha descrito acoplamiento con la forma excitatoria  $G_s$  (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; Pacheco et al., 1991). Se piensa que es la subunidad  $\alpha$  de la proteína G la que se encarga de iniciar la señal intracelular además de mediar la acción sobre la AC (Sunahara et al., 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 (Patton et al., 2004). Los subtipos  $G_i/o$  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  $G_s$  estimula a la AC (Bonhaus et al., 1998; Glass y Felder, 1997), incrementándose con ello los niveles de AMPc (Glass y Felder, 1997).

#### Actuación sobre Canales Iónicos

Solamente el receptor cannabinoide CB1, no el CB2, es capaz de modificar el estado de los canales iónicos de calcio y potasio, (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  $G_i/o$ ) a nivel presináptico, lo que perjudica la liberación de neurotransmisores desde este terminal (Felder et al., 1993; Kreitzer y Malenka, 2007; Mackie y Hille, 1992). En cuanto a los canales de potasio, se sabe que los cannabinoides pueden aumentar su conductancia, tanto por mecanismos ligados a proteínas G como por actuación directa sobre el canal de potasio tipo A (Heyser et al.,

1993; Mackie et al., 1995). Más recientemente, se ha observado que la liberación de endocannabinoides puede hiperpolarizar la membrana neuronal a través de un aumento de la conductancia al ion  $\text{Cl}^-$  y que este fenómeno dependería de la activación del receptor CB2 (den Boon et al., 2012).

#### 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 (Dalterio et al., 1978), a través de la activación del receptor CB1. Este ácido araquidónico desencadenaría toda una cascada de reacciones (Hunter y 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 (Rinaldi-Carmona et al., 1998). El receptor cannabinoide puede activar también la vía de las kinasas PKB/Akt (Gomez del Pulgar et al., 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 de células normales en cancerosas (Vivanco y 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 ciclooxigenasa (COX-2) a través de la acción cannabinoide (Campbell et al., 2001; Hinz et al., 2004).

#### Síntesis de Óxido Nítrico

Los cannabinoides pueden aumentar la expresión del óxido nítrico (NO) a través de la activación de la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) (Fimiani et al., 1999). El NO 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 sustancias. A este respecto se ha demostrado que la AEA inhibe la producción de ON inducido por citoquinas (Mbvundula et al., 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 (Rinaldi-Carmona et al., 1998), quizá mediada por fosforilación de la ruta de las MAPK (Rinaldi-Carmona et al., 1998). 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. También se ha visto que el cannabidiol es capaz de ejercer un efecto antiapoptótico, antioxidativo y neuroprotector, inactivando a la caspasa 3 y a diferentes especies reactivas de oxígeno (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 $\alpha$ ) (Kaplan et al., 2003) y quemoquinas CXCL10, CCL2 y CCL5 (en astrocitos) (Sheng et al., 2005), la inhibición de NF $\kappa$ B (Sancho et al., 2003) y la facilitación en la liberación de elementos antiinflamatorios como las citoquinas IL-4, IL-10 (Klein et al., 2000), IL-6 (Molina-Holgado et al., 1998) e IL-1ra (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 et al., 2007), así como la vía de la diana mecánica de la rapamicina (mTOR), afectando así a procesos clave de la síntesis de proteínas y la plasticidad sináptica (Puighermanal et al., 2013; Puighermanal, Marsicano, Busquets-garcía, Lutz, & Maldonado, 2009).

#### 1.1.4. Cannabinoides y sistema inmune

Las estrechas conexiones entre el sistema inmune y el sistema endocannabinoide se conocen desde la descripción en 1993 del segundo receptor de cannabinoides, el CB2, cuando se vio que tenía amplia expresión en muchas de las líneas celulares que lo componen, especialmente en linfocitos B y macrófagos (Munro et al., 1993; Cabral et al., 2008). Hoy sabemos que el que se consideró el receptor de cannabinoides del sistema nervioso central, el CB1, también se expresa en células del sistema inmune, y que algunas de ellas, al igual que la microglía, sintetizan los dos principales endocannabinoides, la AEA y el 2-AG (Salzet et al., 2000).

A pesar de la cantidad de estudios científicos que han abordado el tema, las relaciones entre el sistema endocannabinoide y el sistema inmune están lejos de ser completamente dilucidadas, ya que ambos sistemas encierran una enorme complejidad. Para hacernos una idea de la complejidad de estos estudios, comentaremos que la expresión de los receptores de cannabinoides en la superficie de las células inmunes depende del grado de activación de estas (Carlisle et al., 2002) y que los efectos que los cannabinoides ejercen sobre las células del sistema inmune

presentan, en muchas ocasiones, un marcado efecto bifásico, pudiendo actuar en función de su concentración en un sentido o en el contrario (Croxford y Yamamura, 2005).

Hay constancia de la producción de AEA en células del sistema inmune, donde, al igual que ocurre en las neuronas, presenta mayor afinidad por el receptor CB1 que por el CB2 (Yang et al., 1999; Croxford y Yamamura, 2005). Por el contrario, el 2-AG, que es expresado en mayor cantidad que la anadamida, en células inmunes muestra mayor afinidad por el receptor CB2 que por el CB1, y se piensa que a través de su acoplamiento a CB2 puede estimular la respuesta quimiotática de las células gliales (Cabral et al., 2008). Además de endocannabinoides, las células del sistema inmune también sintetizan moléculas cannabimiméticas. Así, se tiene constancia de que en procesos inflamatorios, las células inmunes producen palmitoiletanolamida (PEA), inhibiendo a los mastocitos y regulando a la baja la producción de factores proinflamatorios. Se cree que en este efecto está implicado el receptor CB2, aunque de manera indirecta ya que PEA no se une a ninguno de los receptores de cannabinoides (Facci et al., 1995; Calignano et al., 1998).

Resumimos a continuación los efectos que los cannabinoides producen en función de de la línea celular del sistema inmune sobre la que actúen:

- Linfocitos T: Los cannabinoides afectan al número y a la proliferación de los linfocitos T, a la producción de citoquinas específicas de los linfocitos T colaboradores 1 y 2 y a la secreción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Croxford y Yamamura, 2005). Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) parecen ser más sensibles a los cannabinoides que los linfocitos T colaboradores (CD4+). Los cannabinoides afectan a su capacidad citotóxica sin influir, aparentemente, sobre su unión con las células objetivo (Fischer-Stenger et al., 1992). En cuanto a su acción sobre los linfocitos T colaboradores, sabemos que alteran el balance entre sus dos tipos principales, reducen los del tipo 1 (Th1) y aumentan los del tipo 2 (Th2),

participando los dos tipos de receptores de cannabinoides, CB1 y CB2, en la creación de este sesgo (Yuan et al., 2002). También se ha demostrado que la AEA, en una concentración similar a la que regula la respuesta neuronal, produce una inhibición dosis dependiente de la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos (Schwarz et al., 1994) y que el 2-AG tiene un fuerte efecto modulador de esta proliferación en esplenocitos, aumentándola en condiciones de alta concentración celular y disminuyéndola cuando la concentración celular es baja (Lee et al., 1995).

- Linfocitos B: Se ha comprobado que los cannabinoides pueden afectar al número, a la proliferación, a la migración, a la producción de inmunoglobulinas o al cambio de isotipos de linfocitos B (Croxford y Yamamura, 2005). Los receptores CB2 parecen estar implicados en los cambios que provocan los cannabinoides sobre su migración y diferenciación (Jorda et al., 2002; Ziring et al., 2006). Los cannabinoides pueden actuar diferencialmente sobre su proliferación, con un efecto bifásico similar al que vimos que provocaba sobre los linfocitos T, actuando a dosis bajas como inductores de su proliferación y como inhibidores a dosis elevadas (Croxford y Yamamura, 2005). También se ha demostrado el papel de los receptores de cannabinoides en el cambio de inmunoglobulina M (IgM) a inmunoglobulina E (IgE) (Agudelo et al., 2008). Además de sus efectos directos sobre esta población leucocitaria, los cannabinoides pueden jugar un papel positivo en su movilización durante la respuesta inmune, indirectamente a través de sus acciones sobre los macrófagos y sobre los linfocitos T, necesarios para activar a los linfocitos B (Croxford y Yamamura, 2005).
- Natural Killer: varios estudios en animales muestran que su proliferación y su citotoxicidad puede verse afectada por tratamientos con cannabinoides, y que en este efecto están involucrados los receptores CB1 y CB2. Sin

embargo, en humanos, las funciones de este tipo de células no parecen verse afectadas significativamente por los cannabinoides (Massi et al., 2006).

- Macrófagos: Como en otras células inmunes, la relación de los cannabinoides y los macrófagos es bidireccional. El patrón de expresión de CB2 depende de su estado de activación, siendo máxima en los estados más activados y mínima en los menos activados. Los cannabinoides afectarán de manera coherente a esta “ventana de activación”, a sus propiedades de procesamiento y presentación de antígenos, a su capacidad quimiotáctica y a su capacidad fagocítica (Klein y Cabral, 2006). Además, los macrófagos sintetizan AEA y 2-AG, pudiendo modular la respuesta inmune y la diferenciación celular (Ross et al., 2000; Massi et al., 2006).
- Neutrófilos: Los receptores de cannabinoides pueden ser expresados por los neutrófilos (Galiegue et al., 1995). Sin embargo, no parece que los receptores de cannabinoides intervengan en el potente efecto inhibitor que sobre su migración producen los endocannabinoides en humanos (Kraft et al., 2004).
- Mastocitos: Estas células se encuentran en el sistema nervioso, en tejido conectivo y en mucosas, y están involucrados en procesos alérgicos y en la respuesta inflamatoria. Los endocannabinoides y algunos compuestos cannabimiméticos, como PEA, pueden actuar controlando su activación y degranulación durante la respuesta inflamatoria (De Filippis et al., 2008).

## 1.2 El sistema opioide endógeno

En las décadas de los años cincuenta y sesenta del siglo XX, en la comunidad científica se venía proponiendo la existencia de lugares de unión endógenos para la morfina. La evidencia se fue acumulando hasta que en 1973, varios grupos describieron estos lugares de unión en el tejido nervioso (Pert y Snyder 1973; Simon et al., 1973, Terenius, 1973). Este hecho podría considerarse el punto de partida de la



**Figura 6.** Planta de la adormidera  
*Papaver Somniferum*

investigación científica del sistema opioide endógeno. Un tema arduo y complejo que, a pesar de ser uno de los campos de la neurociencia más prolíficos, superando incluso al comentado sistema endocannabinoide, aún guarda muchas incógnitas por desvelar.

Hoy día sabemos que este sistema está compuesto por varios opioides endógenos, todos de naturaleza peptídica, los propéptidos de los que se forman, varios receptores de membrana a los que se unen específicamente y las enzimas responsables de su síntesis y degradación (Befort

K., 2015); que tiene una amplísima distribución en el sistema nervioso central y modula la liberación de otros neurotransmisores, siendo su papel especialmente destacable en los circuitos neurales que controlan los fenómenos de adicción, motivación, refuerzo, aprendizaje y estrés (Mansour et al., 1995; Le Merrer et al., 2009; Koob and Volkow, 2010; Erbs et al., 2014); y que además participa en la regulación de un amplio rango de funciones fisiológicas incluyendo la nocicepción, el estado de ánimo, la conducta de ingesta y los procesos cognitivos (Contet et al., 2004; Pradhan et al., 2011; Stein, 2013; Bodnar, 2014; Nogueiras et al., 2014).

### 1.2.1. Opioides endógenos

La distribución anatómica de los receptores descritos en 1973 no correlacionaba con ningún sistema de neurotransmisión conocido. Además, la analgesia inducida por estimulación eléctrica de zonas específicas del sistema nervioso central era antagonizada por naloxona y había evidencia científica de tolerancia cruzada entre la analgesia inducida por la morfina y la inducida por la estimulación eléctrica. Estas pruebas apoyaban la hipótesis de la existencia de ligandos endógenos para estos receptores opioides, lo que llevó a Terenius y Wahlstrom (1974) a estudiar extractos de cerebro de cerdo y descubrir que inhibían las contracciones del íleon inducidas eléctricamente (prueba tradicionalmente aceptada como inducida por opioides), y a Hughes (1975) a encontrar moléculas de dichos extractos que se unían de manera específica a los receptores opioides. Posteriormente se secuenció la cadena de aminoácidos de los dos primeros opioides endógenos descubiertos, la Met-Enkefalina (H-Tir-Gli-Gli-Fen-Met-OH) y la Leu-Enkefalina (H-Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-OH), denominados *encefalinas* por provenir de extractos de cerebro. Poco después se observó que la cadena de la Met-Enkefalina era en realidad el extremo N-terminal del fragmento C aislado de una hormona movilizadora de grasa aislada en la hipófisis, la  $\beta$ -lipoproteína (Bradbury, 1976). Este fragmento C se identificó como  $\beta$ -endorfina constituyéndose la segunda familia de opioides endógenos clásicos: las  $\beta$ -endorfinas. Tanto las encefalinas como las  $\beta$ -endorfinas ejercen acciones similares a la morfina (inducen analgesia y tolerancia y son autoadministradas por los animales de laboratorio) (Van Ree et al., 1999). La triada clásica de opioides endógenos se completó en 1979 cuando Goldstein aisló su tercer miembro: las dinorfinas (Goldstein et al., 1979, 1980).

En 1995 se añadió un nuevo miembro a la familia de opioides endógenos, un péptido de 17 aminoácidos al que se llamó *nociceptina*, por su habilidad para provocar hiperalgesia en ratones al administrarlo por vía supraespal (Meunier et al., 1995), y

*orfanina FQ* por su alta afinidad por un receptor, con alta homología con los receptores de opioides clásicos, hasta entonces huérfano de ligando endógeno y por el primero y el último de sus residuos aminoacídicos (F de fenilalanina y Q de glutamina), generalmente mencionado según su abreviatura N/OFQ (Reinscheid et al., 1995).

Las últimas moléculas en ingresar en la gran familia de opioides endógenos son las endomorfinas. En 1997 el grupo de Zadina identificó dos tetrapéptidos que solo varían en un aminoácido de su cadena peptídica y que muestran la mayor afinidad y selectividad por el receptor  $\mu$  de todos los péptidos endógenos estudiados hasta el momento, superando incluso a la  $\beta$ -endorfina (Zadina et al., 1997). Estos tetrapéptidos fueron aislados de extractos de corteza cerebral bovina y humana y demostraron una potente acción agonista  $\mu$  con efectos analgésicos en múltiples pruebas de antinocicepción (Zadina et al., 1997; Hackler et al., 1997; Goldberg et al., 1998; Tseng et al., 2000). Por esta altísima afinidad por el receptor de la morfina, el receptor  $\mu$ , fueron denominados endomorfinas 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) y endomorfinas 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>).

Todos estos péptidos opioides se forman a partir de su propéptido correspondiente (aunque aún no se ha clonado el gen de la molécula precursora de las endomorfinas), el cual debe ser procesado por enzimas proteolíticas en el aparato de Golgi y almacenado en vesículas hasta su liberación. La similitud que muestran estos propéptidos ha llevado a algunos investigadores a postular que proceden de un gen ancestral común (Akil, Bronstein y Manssur, 1988).

El propéptido de la  $\beta$ -endorfina es la proopiomelanocortina (POMC), un péptido de 267 aminoácidos que dependiendo del procesamiento postraduccional que se realice dará lugar a un producto peptídico u otro. Las variedades de empalme son, entre otras, la hormona  $\alpha$ -estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH), y la  $\beta$ -endorfina. El procesamiento a  $\beta$ -endorfina se lleva a cabo en la adenohipófisis.

La proencefalina (PENK) es la molécula precursora de las encefalinas. Es un péptido de 267 aminoácidos (los mismos que la proopiomelanocortina) que contiene entre otras, cuatro copias de la Met-Encefalina y una copia de la Leu-Encefalina.

El gen de la Prodinorfina codifica un péptido de 254 aminoácidos que contiene las  $\alpha$  y  $\beta$  neoendorfinas, y varios péptidos que contienen Leu-Encefalina como la Dinorfina A y la Dinorfina B.

El precursor de la nociceptina, la *prepronociceptina* (PPNOC), está compuesto por 176 aminoácidos y codifica, además del opioide endógeno ya comentado, dos péptidos adicionales de los que aún no se conoce su receptor específico, la N/OFQ-II de 17 aminoácidos y la *nocistatina* (NST) de 30 aminoácidos en humanos (Figura 7) (Calo et al., 2000).

Además de conocer los propéptidos a partir de los cuales se forman, para comprender cómo funcionan los opioides endógenos necesitamos conocer los mecanismos de su inactivación y degradación. Las moléculas encargadas de estas tareas son las peptidasas, unas enzimas capaces de degradar los péptidos a sus aminoácidos constitutivos atacando el enlace peptídico que los mantiene unidos. Las dos peptidasas que parecen más específicas para los opioides endógenos son la endopeptidasa-24.11 (encefalinas) y la aminopeptidasa-N (Roques et al., 1993).

Para averiguar en qué circuitos neuronales se expresan los opioides endógenos, lo más accesible fue localizar los propéptidos mediante técnicas inmunohistoquímicas y por hibridación *in situ*. Así, hoy sabemos que la PENK tiene una amplia distribución por el sistema nervioso y parece ser el más abundante de los tres propéptidos. Es especialmente significativa su expresión en la vía estriatopalidal, en concreto en las neuronas espinosas de medio tamaño, que son eminentemente GABAérgicas (de hecho se ha comprobado una colocalización de PENK y la enzima ácido glutámico descarboxilasa, que es el principal marcador para el ácido  $\gamma$  amino butírico –GABA–; Elde y Hökfelt, 1993). La dopamina que se libera en el cuerpo estriado es clave para el correcto funcionamiento del sistema extrapiramidal y, por lo

tanto, para controlar y coordinar del movimiento. El hallazgo de que la dopamina regulaba los niveles de PENK en el estriado confirmó un papel importante para los péptidos derivados de PENK en el control motor. (Holt, 1993).

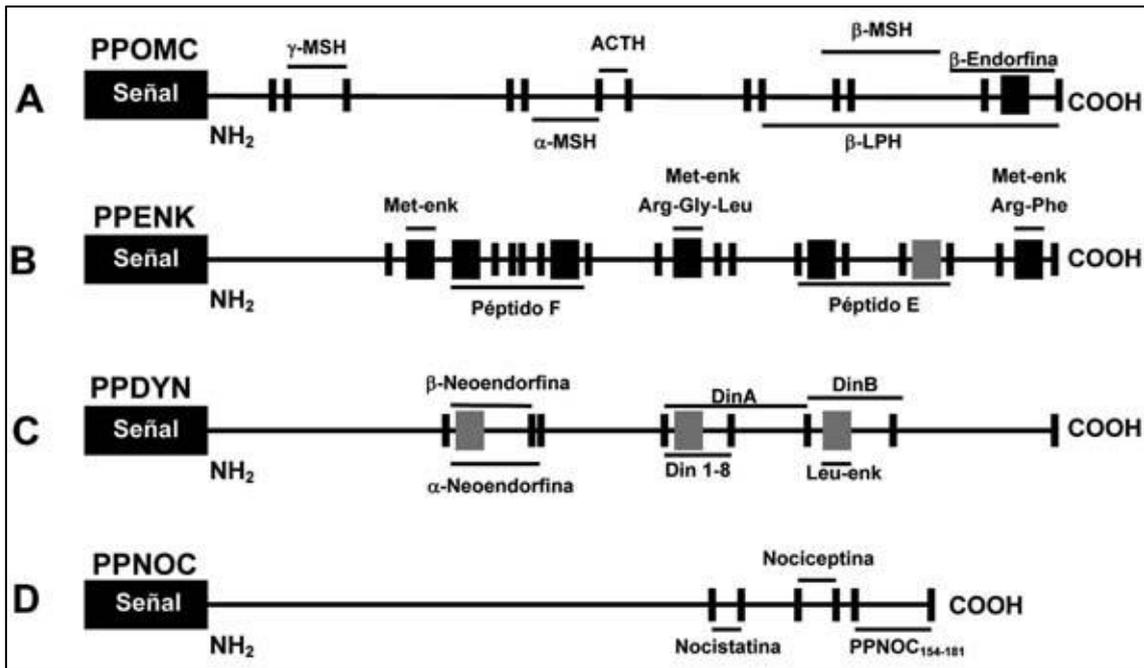
Otras zonas del cerebro en las que se ha encontrado una alta expresión de PENK son el núcleo ventromedial del hipotálamo, donde podría estar modulando la regulación hormonal del ciclo estral en las hembras (Romano et al., 1990), y en las células granulares del giro dentado del hipocampo, donde podría estar regulando las convulsiones inducidas por el agonismo  $\mu$  o  $\sigma$  y los efectos anticonvulsivos del agonismo  $\kappa$  (Morris y Johnston, 1995).

Respecto a la localización anatómica del propéptido de las  $\beta$ -endorfinas, se ha encontrado expresión de POMC en los ganglios de la base, el córtex, la amígdala y en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Uno de los lugares donde se sintetiza más POMC es en el núcleo arqueado del hipotálamo que manda eferencias al núcleo del tracto solitario en el bulbo raquídeo. En el núcleo arqueado, la síntesis de POMC está bajo control de los esteroides gonadales (al igual que ocurría con PENK), lo que otorga un papel a las  $\beta$ -endorfinas en la fisiología reproductiva. Por otro lado, el núcleo del tracto solitario parece ser el origen del sistema analgésico descentente, por lo que las  $\beta$ -endorfinas tendrían un papel mediador en la analgesia supraespinal. Por último, la síntesis de POMC en la pituitaria está bajo control negativo de los esteroides adrenales, sugiriendo una relación entre el estrés y el control del dolor (Young, Bronstein y Akil, 1993).

El tercer propéptido, la prodinorfina, presenta una localización anatómica similar a la PENK, y de hecho hay cotransmisión de sus péptidos derivados en algunas neuronas. Se ha detectado prodinorfina en el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, el cuerpo estriado y en la médula espinal, lo que sugiere que la dinorfina desempeña funciones relacionadas con el aprendizaje y la memoria, el control emocional, la respuesta de estrés y la transmisión del dolor (Schwarcer, 2009).

La PPNOC tiene una amplia distribución en el sistema nervioso central. Se ha encontrado expresión del gen que codifica este péptido en las astas dorsal y ventral de la médula espinal, en el córtex frontal, la corteza olfatoria, el tálamo, el hipocampo, el septum, el núcleo del lecho de la estría terminal, la banda diagonal de Broca, la habénula, el complejo amigdalóide y en varios núcleos del hipotálamo (Peluso et al., 1998; Berthele et al., 2003; Witta et al., 2004). También se expresa en núcleos principalmente serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos como los núcleos del rafe, el locus coeruleus (LC), el núcleo del tracto solitario, el área tegmental ventral (ATV) y la sustancia negra (Neal et al., 1999a; Mollereau and Mouldous, 2000). Por la distribución de su péptido, se piensa que la N/OFQ participa en la modulación de múltiples respuestas fisiológicas, como la ansiedad (Jenck et al., 1997), la conducta de ingesta (Pomonis et al., 1996), el aprendizaje y la memoria (Sandin et al., 1997) y la actividad locomotora (Reinscheid et al., 1995; Florin et al., 1996).

Aunque, como comentamos, aún no se ha clonado el péptido a partir del cual se forman las endomorfinas, a través de radioinmunoensayos (RIA) y de análisis inmunocitoquímicos hoy sabemos que la endorfina 1 y la endorfina 2 están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central de ratas, primates y humanos (Hackler et al., 1997; Anton et al., 1998; Schreff et al. 1998), mostrando una localización preferencial en áreas donde el receptor  $\mu$  es ampliamente expresado (Abbadie et al., 2002). Ambas moléculas fueron localizadas en regiones similares del encéfalo de rata (estria terminal, sustancia gris periacueductal, LC, núcleo parabraquial, hipotálamo y núcleo del tracto solitario), pero mientras la mayor densidad de expresión de la endorfina 1 se manifestó en estructuras del encéfalo anterior y en áreas superiores del tallo cerebral, la endorfina 2 mostró su máxima expresión en áreas inferiores del tallo cerebral y en la médula espinal (Martin-Schild et al., 1999; Pierce et al., 2000).



**Figura 7: Esquema de los genes que codifican los péptidos opioides. A:** Preproopiomelanocortina (PPOMC) y sus fragmentos  $\beta$ -endorfina, hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -MSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y hormona lipotrópica  $\beta$  ( $\beta$ -LPH). **B:** Preproencefalina (PPENK) y sus fragmentos metionina-encefalina (Met-enk), leucina-encefalina (Leu-enk), péptido E y F. **C:** Preprodinorfina (PPDYN) y sus fragmentos  $\alpha$  y  $\beta$  neoendorfina, dinorfina A, B y 1-8 (DinA, DinB y Din1-8). **D:** Prepronociceptina (PPNOC) y sus fragmentos nocistatina, nociceptina y prepronociceptina<sub>154-181</sub>, (PPNOC<sub>154-181</sub>). (Vega 2005)

Como ya hemos indicado previamente, la inactivación y degradación de los péptidos opioides es llevada a cabo por enzimas peptidasas, que los degradan a sus aminoácidos constitutivos atacando los enlaces peptídicos que los unen. Las dos peptidasas que parecen más específicas para los opioides endógenos son la endopeptidasa-24.11 (encefalinas) y la aminopeptidasa-N (Roques, Noble et al. 1993)

### 1.2.2. Receptores opioides

La primera evidencia de la existencia de diferentes subtipos de receptores para los opioides fue publicada por Martin y colaboradores en 1976. Usando métodos de farmacología convencional demostraron que si bien la morfina aliviaba el síndrome de

abstinencia en perros dependientes, un análogo sintético de la misma, la ketociclazocina, era inefectiva. Además, la tolerancia a un tipo de opiáceos no provocaba tolerancia cruzada a otro tipo de opiáceos como se hubiera esperado si éstos actuaran sobre el mismo receptor. Por esto propusieron la existencia de tres subtipos diferentes de receptores opioides, nominándolos según la molécula que fuera capaz de activarlos: el receptor  $\mu$ , estimulado por la morfina, el receptor  $\kappa$ , activado por la ketociclazocina y el receptor  $\sigma$ , que presenta alta afinidad por el compuesto experimental SKF-10,047 (Martin et al., 1976).

Un año más tarde, se describió la existencia de un cuarto receptor, el receptor  $\delta$  (por estar muy concentrado en el *vas deferens* del ratón) (Lord et al., 1977). Progresivamente, se acumularon evidencias que mostraban que el receptor  $\sigma$  no era de naturaleza opioide, sino que más bien se unía a la fenciclidina (PCP) y a algunos fármacos antipsicóticos como el haloperidol (Mannalack et al., 1986). Así, se configuró la clásica tríada de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ).

Desde 1994 hay evidencias científicas que permiten hablar de un cuarto receptor, del que, hasta hace poco, se desconocía cuál era su ligando y por tanto se le llamó el “receptor huérfano”. Hoy sabemos que se une a la nociceptina, también llamada orfanina FQ (Meunier et al., 1995 y Reinscheid et al., 1995). A este receptor se le llamó receptor para la orfanina FQ, receptor para la nociceptina o bien ORL-1 (*opiod-like receptor 1*).

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La estructura de los distintos receptores opioides es similar, perteneciendo todos, al igual que los receptores de cannabinoides, a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (predominantemente  $G_i$ , aunque también  $G_s$ ), con siete dominios transmembrana formados con una muy alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos en estructura de alfa hélice, cuya secuencia guarda una alta homología

(alrededor del 70%) entre los miembros de la triada clásica,  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Mollereau et al., 1994). Expuestos al exterior celular quedarían el extremo amino terminal y tres bucles conectando los dominios transmembrana, los dos primeros unidos por un puente disulfuro, que podrían participar en la unión con el ligando (Metzger y Ferguson, 1995), y en la zona citoplasmática quedarían, además de la cola carboxi terminal, otros tres bucles que se piensa que estarían involucrados en la interacción con la proteína G (Metzger y Ferguson, 1995; Georgoussi et al., 1997; Megaritis et al., 2000).

La triada clásica de receptores comparte una estructura común resultado de la traducción de tres exones: el primer exón codificando el extremo N-terminal y el primer dominio transmembrana, y el segundo y tercer exón codificando cada uno tres de los seis dominios transmembrana restantes (Pasternak, 2014). El receptor  $\mu$  cuenta además con un cuarto exón que codifica solo doce aminoácidos en el final del extremo C-terminal (Figura 8). A lo largo de años de investigación se han descubierto numerosas variantes del receptor  $\mu$  por procesamiento postransduccional alternativo. Han sido aisladas 31 variantes en ratones (Doyle et al., 2007; Pan et al., 2009a), 16 en ratas (Pasternak et al., 2004; Xu et al., 2011) y 19 en humanos (Cadet et al., 2003; Shabalina et al., 2009; Xu et al., 2009).

En cuanto al receptor ORL-1, aunque comparte entre un 63 y un 65% de la secuencia aminoacídica con los receptores de la triada clásica, pequeñas diferencias en esta explican sus distintos perfiles de unión a los péptidos opioides. Concretamente, el receptor ORL-1 presenta una molécula de alanina en la posición 216 de su secuencia de aminoácidos (Ala<sup>216</sup>) en vez de una molécula de lisina (Lys), una de glutamina en la posición 280 (Gln<sup>280</sup>) en vez de histidina (His), y una de treonina en la posición 305 (Thr<sup>305</sup>) en vez de isoleucina (Ile) (Granier et al., 2012; Thompson et al., 2012). Estas variaciones, aunque parecen mínimas, afectan al perfil de unión con sus ligandos por estar situadas en el bolsillo de unión a sus agonistas y antagonistas y alterar sus características hidrofílicas.

## DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA Y CORRELACIÓN FUNCIONAL

Los receptores opioides están ampliamente distribuidos tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos y células del sistema inmune. Debido a su amplitud, referimos a continuación un resumen de su distribución en las distintas estructuras del sistema nervioso central. La diferente distribución de cada tipo de receptor opioide explica la amplitud de respuestas farmacológicas observadas tras la administración de los diferentes agonistas (Allouche et al., 2014).

### Receptor $\mu$

El ligando exógeno para este receptor es la morfina, los ligandos endógenos, son la  $\beta$ -endorfina y las endomorfinas 1 y 2 principalmente, aunque también hay evidencia de unión a encefalinas, por lo que podría considerarse al receptor  $\mu$  el receptor opioide por excelencia. La distribución anatómica de este receptor es amplia dentro del Sistema Nervioso Central, siendo en los núcleos caudado y putamen donde se ha encontrado mayor densidad en su expresión. Pueden observarse altos niveles de expresión del receptor  $\mu$  en córtex, tálamo, NAcc, hipocampo y amígdala. Niveles moderados en la sustancia gris periacueductal y núcleos del rafe, y bajos niveles de expresión en el hipotálamo, área preóptica y globo pálido (Quirion et al., 1993). También se ha encontrado expresión de este receptor en la capa superficial del asta dorsal de la médula espinal (Besse et al., 1990). Esta amplia distribución del receptor  $\mu$  en áreas espinales y supraespinales, apoya su participación en el control de múltiples funciones fisiológicas. Así, además de controlar la nocicepción, participa en el control del circuito de recompensa, de la respiración, de las funciones cardiovasculares, del tránsito intestinal, de la ingesta de alimentos, del aprendizaje y la memoria, de la actividad locomotora, de la termorregulación, de la secreción hormonal y de la respuesta inmune (Dhawan et al., 1996; Kieffer, 1999; Bodnar, 2014).

### Receptor $\kappa$

Como ya hemos comentado, el ligando exógeno para este receptor es la ketociclazocina, que tiene efectos disfóricos y alucinatorios, sugiriendo un papel para el receptor  $\kappa$  en la psicosis. El ligando endógeno para este receptor son las dinorfinas. La densidad de receptores  $\kappa$  es la que presenta más variabilidad, de entre los receptores opioides, entre las distintas especies de mamíferos. Así, mientras en la rata representa aproximadamente un 10% del total de receptores opioides de su sistema nervioso central, en otras especies de mamíferos, como las cobayas, monos y humanos, este porcentaje aumenta hasta alcanzar al menos un tercio de la población total de dichos receptores (Dhawan et al., 1996). El receptor  $\kappa$  está ampliamente distribuido en núcleos del prosencéfalo, mesencéfalo y tronco encefálico, y participa en la regulación de múltiples funciones, incluyendo la nocicepción, la diuresis, el estado de ánimo, la alimentación y las secreciones neuroendocrinas (Tejeda et al., 2012; Bodnar, 2014).

### Receptor $\delta$

Comparados con los receptores  $\mu$  y  $\kappa$ , los receptores  $\delta$  tienen un área de distribución más restringida, mostrando su máxima densidad en regiones prosencefálicas, permaneciendo esta distribución bien conservada a lo largo de las distintas especies de mamíferos. En el núcleo caudado, en el putamen, en el córtex y en la amígdala se observa una alta densidad de estos receptores, mientras en el tálamo y el hipotálamo, si se encuentran, será de modo mucho más disperso. Hoy día, tenemos evidencia científica de que participan en la regulación de la nocicepción, de la actividad locomotora, de la motilidad gastrointestinal, de la capacidad olfativa, del estado de ánimo y de las funciones cognitivas (Dhawan et al., 1996; Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2002; Bodnar, 2014).

**Tabla 2 :** Los receptores opioides, sus ligandos endógenos y exógenos y su distribución en los diferentes tejidos (Chuang, Killam et al. 1995; Mansour, Fox et al. 1995; Feldman, Meyer et al. 1997).

Receptor	$\mu$	$\delta$	$\kappa$	ORL-1
<b>Ligandos endógenos</b>	$\beta$ -Endorfinas Endomorfina 1 y 2 Enkefalinas	Enkefalinas	Dinorfinas	Nociceptina
<b>Ligandos exógenos</b>	Morfina DAMGO Fentanilo	DPDPE Deltorfina	Ketociclazocina U69593	Nociceptina Ro 64-6198
<b>Distribución</b>	- Corteza - Estriado - Núcleo Accumbens - Amígdala - Colículos superiores e inferiores - <i>Locus Coeruleus</i> - Núcleo del Tracto solitario - Nucleo espinal del trigémino - Asta dorsal de la médula espinal - Sustancia gris periacueductal - Núcleos del rafe - Tracto gastrointestinal - Sistema inmune	- Corteza - Estriado - Áreas olfativas - Sustancia negra - Núcleo Accumbens - Tracto gastrointestinal - Corazón - Sistema inmune	- Área preóptica - Eminencia media - Estriado - Amígdala - Accumbens - Hipófisis - Núcleo del tracto solitario - Sustancia gris periacueductal - Núcleos del rafe - Núcleo espinal del trigémino - Asta dorsal de la médula - Corazón - Sistema inmune	- Corteza - Tálamo - Amígdala - Hipocampo - Sustancia gris periacueductal - Sustancia negra - Asta dorsal de la médula

### Receptor ORL-1

Este cuarto receptor opioide también tiene una amplia distribución en el sistema nervioso central de roedores, primates no humanos y humanos (Mollereau y Mouldous, 2000; Civelli, 2008). Encontramos su expresión en los ganglios de la raíz dorsal y en las astas dorsal y ventral de la médula espinal, en el prosencéfalo, incluyendo áreas corticales y regiones olfatorias, en el tálamo, en una variedad de estructuras límbicas como el hipocampo, el septum, el núcleo del lecho (*bed nucleus*) de la estría terminal, la banda diagonal de Broca, la habénula, el complejo amigdaloides

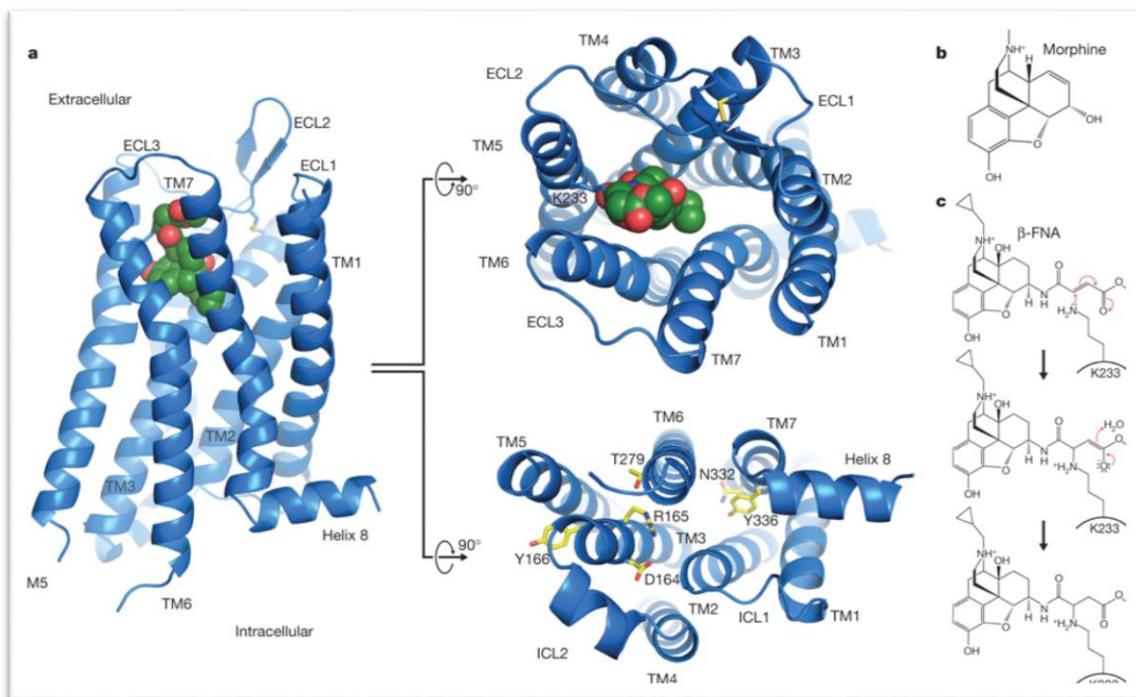
y en varios núcleos hipotalámicos implicados en el procesamiento de estímulos emocionales (Schröder et al., 2014). También se expresa en núcleos serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos, como los núcleos del rafe, el LC, el núcleo del tracto solitario, el ATV y la sustancia negra (Ver Tabla 2) (Neal et al., 1999a; Mollereau y Mouldous, 2000). Este receptor participa en la modulación de varios sistemas y respuestas fisiológicas, incluyendo la ansiedad (Jenk et al., 1997), la ingesta de alimentos (Pomonis et al., 1996), el aprendizaje y la memoria (Sandin et al., 1997), la actividad locomotora (Reinscheid et al., 1995; Florin et al., 1996), el sistema respiratorio (Corboz et al., 2000; 2001; Takita et al., 2003; Singh et al 2013), el sistema inmune (Peluso et al., 2001; Serhan et al., 2001) y las funciones renal y cardiovascular (Kapusta et al., 1997).

## MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN

Los receptores opioides, al igual que los ya comentados receptores de cannabinoides, son receptores acoplados a proteínas G cuya activación puede iniciar una diversidad de cascadas intracelulares cuya descripción exhaustiva está fuera del ámbito de la presente tesis doctoral. Recientemente está tomando fuerza un concepto que ahonda más aún en la complejidad de respuestas de sistemas basados en receptores acoplados a proteínas G, el denominado agonismo sesgado (*biased agonism* en inglés) o selectividad funcional. Según este concepto, la unión de diferentes ligandos a un receptor simple resulta en distintos cambios conformacionales de dicho receptor de manera que cada nueva conformación interactuará preferencialmente con distintas moléculas activando cascadas de señalización específicas (Kenakin, 2011). Los primeros indicios de este fenómeno se obtuvieron precisamente con investigaciones sobre los receptores opioides que demostraban que diferentes ligandos actuando sobre el mismo receptor opioide activaban diferentes subgrupos de proteínas  $G_{\alpha_{i/o}}$  (Allouche et al., 1999a). Teniendo esto en cuenta, comentaremos solo los principales efectores intracelulares estudiados.

El principal efecto, o al menos el más citado en la literatura científica, derivado de la activación de los receptores opioides por sus agonistas, es la inhibición de la AC. Así, hay evidencia de que la estimulación de los receptores  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  (Dhawan et al., 1996; Bian et al., 2012) y ORL-1 (Ma et al., 1997; Klukovits et al., 2010) inhiben la actividad de la AC principalmente a través de proteínas  $G_{i/o}$ . Otros efectores estudiados son la activación de la fosfolipasa C y la vía de las MAPK (Law et al., 2000; Zhang et al., 1999; Lou et al., 1999).

Una de las respuestas más rápidas obtenidas tras la activación de los cuatro tipos de receptores opioides, es la inhibición de los canales de calcio dependiente de voltaje y la activación de los canales de potasio de rectificación interna (Law et al., 2000; Ma et al., 1997; Margas et al., 2008). La activación de los canales de potasio



**Figura 8.** Vista general de la estructura del receptor  $\mu$  opioide

media la hiperpolarización de la membrana neuronal reduciendo su excitabilidad y la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje bloquea la liberación de los neurotransmisores (Allouche et al., 2014).

Si recordamos los mecanismos de traducción comentados al describir el sistema endocannabinoide, encontraremos una estrecha coincidencia con los del sistema opioide endógeno, pero la relación entre ambos sistemas de neuromodulación parece que va más allá de la mera coincidencia en estas cascadas de señalización intracelular. Aportar luz sobre esta interconexión es el objetivo del siguiente apartado de esta tesis.

### **1.3 Interacciones entre los sistemas endógenos cannabinoide y opioide**

Los receptores cannabinoides y opioides son el objetivo de varias drogas de abuso y de muchos analgésicos ampliamente utilizados y median vías de señalización comunes de importancia central para comprender los fenómenos de dependencia, tolerancia y adicción (Manzanares et al., 1999; Pasternak et al., 2005; Demuth y Molleman, 2006). Las drogas que actúan sobre sus principales receptores, el cannabinoide CB1 y el  $\mu$  opioide, comparten similares perfiles farmacológicos. Los agonistas de ambos receptores causan antinocicepción, sedación, hipotensión, depresión motora y funcionan como drogas de refuerzo (Manzanares et al., 1999; Massi et al., 2001; Maldonado y Valverde, 2003; Corchero et al., 2004a). Los cannabinoides tienen la capacidad de modular la función opioide en la célula a distintos niveles. Desde la asociación directa entre receptores, pasando por la liberación de péptidos endógenos, hasta interacciones en las rutas compartidas de transducción de señales. En muchos estudios se han podido observar estas interacciones evidenciando fenómenos de tolerancia cruzada, potenciación mutua y comunicación cruzada entre receptores (Manzanares et al., 1999; Cichewicz y McCarthy, 2003; Maldonado y Valverde, 2003; Corchero et al., 2004a; Vigano et al., 2005a; Roberts et al., 2006; Cox et al., 2007; Barta et al., 2009; Welch, 2009; Parolaro et al., 2010). Además hoy sabemos que la modulación del receptor CB1 o del receptor  $\mu$ -opioide en muchas ocasiones altera los índices de actividad noradrenérgica y que el circuito noradrenérgico es fundamental para comprender los fenómenos de adicción y

retirada del consumo de sustancias opioides (Nestler, 1993; Nestler et al., 1999; Oropeza et al., 2005; Szabo y Schlicker, 2005).

Hace tiempo que se tiene constancia de la presencia del receptor  $\mu$ -opioides en varias regiones noradrenérgicas, responsables de las adaptaciones que ocurren en respuesta a la exposición a opiáceos y a la precipitación del síndrome que provoca su retirada (Tempel y Zukin, 1987; Maldonado et al., 1992a; Maldonado et al., 1992b; Mansour et al., 1995; Cheng et al., 1996; Ding et al., 1996; Moyse et al., 1997; Pickel y Colago, 1999), pero solo recientemente se ha encontrado evidencia anatómica y funcional de la presencia de receptores cannabinoides en células noradrenérgicas en el núcleo accumbens (NAcc) y en el núcleo del tracto solitario (NTS) (Carvalho et al., 2010a; Carvalho et al., 2010b), en la corteza frotal (Oropeza et al., 2007; Page et al., 2008; Reyes et al., 2009b) y en el LC (Scavone et al., 2010), lo que hace posible postular que el receptor CB1 participa en la modulación de la liberación de norepinefrina que ocurre como resultado de la adicción a opiáceos y su retirada (Reyes et al., 2012). Esta colocación de receptores gana relevancia teniendo en cuenta la creciente evidencia de heteromerización y/o asociación cerrada CB1- $\mu$  (Rios et al., 2001; Mackie, 2005a; Schoffelmeer et al., 2006; Hojo et al., 2008) y que la presencia de estos heterodímeros aumenta con la exposición crónica a drogas o con la estimulación repetida de los receptores (Kearn et al., 2005; Gupta et al., 2010).

Existen numerosos estudios en la literatura científica que demuestran una modulación cannabinoide del sistema opioide en la cascada post-receptor que documentan sinergia cannabinoide-opioide, agonismo y antagonismo cruzados y tolerancia cruzada (Manzanares et al., 1999; Lichtman et al., 2001; Navarro et al., 2001; Valverde et al., 2001; De Vries et al., 2003; Cichewicz, 2004; Fattore et al., 2005b, 2007b). Así, los efectos sinérgicos han permitido resultados clínicos positivos con dosis sub-analgésicas de combinados de agonistas cannabinoides y opioides, que consiguen eludir la tolerancia inherente a la administración crónica de morfina (Cichewicz et al., 1999; Cichewicz y McCarthy, 2003; Cichewicz, 2004; Smith et al.,

2007) y el antagonismo cruzado ha permitido reducir los signos provocados por la retirada de opiáceos al administrar un antagonista cannabinoide durante la exposición crónica a las sustancias opioides (Rubino et al., 2000; Mas-Nieto et al., 2001).

El mecanismo por el cual los cannabinoides son capaces de modular el sistema opioide puede no ser único. Hay numerosos estudios de dan cuenta de una variación en la liberación de péptidos opioides después de un tratamiento con cannabinoides, sugiriendo que el receptor cannabinoide CB1 puede jugar un papel regulador en la liberación de opioides endógenos (Corchero et al., 1997a, 1999; Manzanares et al., 1998; Valverde et al., 2001). Por otro lado, hay investigadores que sugieren que el mecanismo responsable es una interacción directa entre los receptores CB1 y  $\mu$  (Rodríguez et al., 2001; Salio et al., 2001; Pickel et al., 2004), llegando algunos grupos, como el de Devi, a proponer la existencia de sistemas heterodiméricos cannabinoides-opioides que interactúan físicamente para integrar vías de señalización independientes (Rios et al., 2006). Otras investigaciones han revelado cambios en la activación de la proteína G acoplada al receptor  $\mu$  inducidos por cannabinoides (Corchero et al. 1999; Vigano et al., 2005b; Ellgren et al., 2008; Rios et al., 2006).

Aunque la intensa investigación desarrollada en este campo ha hecho que la relación cannabinoide-opioide esté cada vez mejor establecida, el mecanismo, o los mecanismos, a través del cual se produce aún no ha sido completamente elucidado.

#### **1.4 Modelos animales y adicción a opiáceos: La autoadministración en ratas Lewis y Fischer<sup>344</sup>**

El uso de modelos animales ha sido de enorme utilidad en la investigación en general y en el estudio de las bases psicobiológicas de las adicciones en particular. De entre todos los modelos disponibles, el de la autoadministración intravenosa en ratas, ratones y monos es el que más se asemeja al patrón de consumo en humanos (Griffiths, Bigelow et al. 2005).

En el contexto de estos modelos, se considera que el trasfondo genético de los individuos es una variable de predisposición importante al consumo de drogas. Para investigar sobre la naturaleza de los factores genéticos que modulan los comportamientos adictivos, disponemos de dos cepas de ratas, la Fischer 344 (F344) y la Lewis (LEW), que son histocompatibles (tienen un haplotipo RT2 idéntico y un haplotipo RT1 compatible) y genéticamente relacionadas, y suelen mostrar patrones de conducta distintos ante la mayoría de las drogas de abuso. Una de estas cepas (la LEW), muestra comportamientos adictivos más intensos y más consistentes que su cepa de comparación (la F344). Describiremos brevemente las diferencias entre estas dos cepas de ratas.

A nivel de conducta, según Kosten y Ambrosio, los comportamientos en los que se ven más diferencias entre ambas razas son los que tienen un elevado componente de reactividad emocional, de estrés o de miedo (Kosten y Ambrosio, 2002).

Estudiando el Reflejo de Sobresalto (*startle*), parece que la respuesta es siempre mayor en las ratas LEW (Cohen et al., 2006). Este reflejo se asocia negativamente con la funcionalidad del eje hipotalámico-hipofisario-adenal (H-H-A), por lo que se puede concluir, al menos tentativamente, que las LEW tienen menor funcionalidad del eje H-H-A. Las respuestas a las pruebas de ansiedad, muestran que las ratas LEW sometidas a restricción alimentaria comen más que las F344 en entornos nuevos y luminosos, mostrándose menos temerosas. Sin embargo, en el Laberinto en Cruz Elevado (LCE) los primeros estudios realizados mostraron que no había diferencias entre las dos cepas (Chaouloff et al., 1995; Kosten y Ambrosio, 2002) pero más recientemente se ha observado que las ratas F344 pasaron más tiempo en los brazos abiertos del LCE (Cohen et al., 2006; van der Staay, Schuurman, van Reenen, & Korte, 2009), aunque este efecto desapareció en el segundo día de prueba (van der Staay et al., 2009)). Esta diferencia en los valores de ansiedad se confirmó utilizando otra prueba, el laberinto circular de luz/oscuridad, en el que se vio

que las ratas F344 pasaban más tiempo en la parte iluminada del laberinto, lo que indica que esta cepa tiene niveles menores de ansiedad que la LEW (van der Staay et al., 2009). No obstante estos resultados, en los tests de actividad locomotora usados para medir la emocionalidad se ha observado de manera más o menos consistente que las F344 son más emocionales que las LEW (Rex et al., 1996).

A nivel farmacológico, podemos estudiar los efectos de las drogas sobre diferentes respuestas incondicionadas y condicionadas.

En relación con los parámetros incondicionados, los efectos locomotores agudos de la cocaína sugieren que la curva dosis-respuesta en la raza LEW es más plana, y en general mayor, que en la raza F344, por lo tanto, la respuesta locomotora incondicionada a la cocaína en las LEW es de mayor potencia, pero menos sensible a los efectos de la dosis, teniendo similares características a lo largo de toda la curva dosis-respuesta (George et al., 1991; Kosten et al., 1994). Repitiendo la administración de una misma dosis de psicoestimulantes y midiendo la actividad locomotora que provoca, para estudiar el desarrollo de sensibilización o tolerancia, se observa que la raza LEW desarrolla sensibilización, exhibiendo un menor nivel de actividad al inicio que se incrementa tras el paso de los días, y la raza F344 desarrolla tolerancia, mostrando inicialmente altos niveles de actividad que decrecen con el paso de los días. Tendrían, por tanto, un patrón con tendencias opuestas (Kosten et al., 1994). No obstante, ambas razas exhiben sensibilización en las estereotipias inducidas por cocaína, siendo más acusada en el caso de las ratas F344 (Sircar y Kim, 1999). En cuanto a los efectos locomotores de la morfina administrada subcutáneamente (1,0 / 5,0 y 10,0 mg/kg) se ha observado que las dosis de morfina de 1,0 y 5,0 mg/kg produjeron incrementos significativos de la actividad locomotora en ambas razas. Sin embargo, no se observó un efecto global del genotipo en la actividad locomotora inducida por la morfina. Por último, en estudios con nicotina, la sensibilización

conductual inducida por inyecciones subcutáneas de la droga es similar en ambas razas (Hamilton, Starosciak, Chwa, & Grunberg, 2012).

En lo que se refiere al estudio de conductas condicionadas, los resultados de pruebas de condicionamiento aversivo gustativo utilizando cocaína, son contradictorios. En un primer estudio, la raza LEW desarrolló condicionamiento aversivo al sabor de la cocaína más rápidamente y a dosis menores que la cepa F344 (Glowa, Shaw, & Riley, 1994). Sin embargo, en otros trabajos no se han encontrado diferencias entre ambas razas (Kosten et al., 1994). Existen no obstante otros trabajos que muestran que la diferencia entre razas (LEW>F344) sólo ocurre en hembras y no en machos (Roma, Davis, & Riley, 2007). Otros autores han descrito que las ratas LEW y F344 no se diferenciaban en el desarrollo de condicionamiento aversivo al sabor con cloruro de litio (Grigson & Freet, 2000 pero ver Foynes & Riley, 2000), aunque las LEW, y no las F344, desarrollaron condicionamiento aversivo al sabor con cocaína y mostraron supresión de la ingestión de sucrosa debido al descenso en la magnitud del reforzador. Estos mismos autores han sugerido que la raza LEW es más sensible a los cambios en el valor de los reforzadores en comparación con la raza F344 (Grigson y Freet, 2000). Se han descrito diferencias entre ambas cepas en el condicionamiento de aversión al sabor inducido por otras drogas, como por ejemplo la morfina que es capaz de inducir aversiones condicionadas al sabor en ratas F344 hembras pero no en la LEW, sin que haya factores farmacocinéticos implicados (Lancellotti, Bayer, Glowa, Houghtling, & Riley, 2001). También se ha observado que las ratas F344 desarrollan aversiones condicionadas al sabor inducidas por la nicotina más fuertes que las LEW (Pescatore, Glowa, & Riley, 2005). En lo relativo al alcohol, las ratas F344 muestran condicionamientos de aversión al sabor mayores con esta droga que las ratas LEW, y este efecto no depende de la hipotermia inducida por el alcohol pero quizás haya variables farmacocinéticas implicadas (Roma, Flint, Higley, & Riley, 2006). Por último, se han examinado los condicionamientos de aversión al sabor

inducidos por THC (Wakeford & Riley, 2014) y la nueva droga de síntesis metilendioxiptovalerona (King, Wetzell, Rice, & Riley, 2014) sin que haya diferencias entre LEW y F344 al respecto.

Utilizando el paradigma de condicionamiento preferencial al sitio, se ha mostrado de manera consistente en diversos trabajos que las ratas Lewis manifiestan mayor condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína y nicotina, en comparación con la raza F344 (T A Kosten, Miserendino, Chi, & Nestler, 1994; Philibin et al., 2005). No obstante, en el caso de la anfetamina, son las ratas F344 las que muestran un mayor condicionamiento de preferencia al lugar (Stohr, Schulte Wermeling, Weiner, & Feldon, 1998). En cuanto a la morfina, los resultados parecen depender del protocolo utilizado para inducir la preferencia al lugar ya que en un estudio en el que se utilizó un protocolo en el que la droga se administra asociada a comida las ratas LEW mostraron mayor condicionamiento que las F344 (Suzuki, Otani, Koike, & Misawa, 1988) mientras que cuando se utiliza un protocolo sesgado, las ratas F344 muestran condicionamiento pero no las LEW (Davis, Roma, Dominguez, & Riley, 2007). No se ha podido establecer un condicionamiento de preferencia por etanol de manera robusta en estas cepas (Roma et al., 2006). Un estudio reciente y de especial relevancia para esta tesis demostró que que las ratas LEW mostraban un condicionamiento de preferencia al lugar inducido por heroína más robusto que las ratas LEW y además demostraron que un tratamiento crónico con THC durante la adolescencia lo potenciaba en las F344 mientras que en las LEW aumentaba el restablecimiento del condicionamiento por una inyección de cebado (*priming*) de heroína (Cristina Cadoni, Simola, Espa, Fenu, & Di Chiara, 2015).

En lo que respecta a los estudios de discriminación de los efectos de las drogas, usando una dosis de 10 mg/Kg de cocaína, no se encontraron diferencias en la discriminación entre las razas Lewis y F344 (Haile et al., 2000). No obstante, una experiencia de estrés previo afectó de manera diferencial a la discriminación de los

efectos de la cocaína. Así, mientras que el estrés por inmovilización aumentó la discriminación en las ratas F344, en las LEW no tuvo tal efecto, mientras que el estrés por shock eléctrico y el asociado al contexto del shock aumentaron la discriminación en LEW pero no en F344 (Therese A. Kosten & Miserendino, 2012). Por otro lado, las ratas F344 adquieren la conducta de discriminación de morfina más rápidamente que las LEW (Morgan et al., 1999). Por lo que respecta a la discriminación de los efectos de la nicotina, las ratas LEW tal conducta con una dosis menor de nicotina que las ratas F344 (Philibin et al., 2005).

La autoadministración de varias drogas ha sido evaluada tanto en la raza Lewis como en la raza F344, y en este caso, el patrón resulta bastante consistente. La raza LEW muestra una conducta de autoadministración más intensa (es decir mayor número de presiones de palanca para conseguir la droga) que la raza F344. Los primeros estudios utilizaron la autoadministración oral y mostraron que la cepa LEW se autoadministraba más etanol (Li y Lumeng, 1984; Suzuki et al., 2001), opioides (Suzuki et al., 2001) y cocaína (George y Goldberg, 1989) que la F344. Sin embargo, un estudio posterior demostró que, con la autoadministración oral, la cocaína no funciona como reforzador en la raza LEW, aunque sí se produjo un aumento de la activación locomotora (Bell et al., 1993). No obstante, la raza Lewis adquirió la autoadministración intravenosa de cocaína a dosis más bajas y en menos ensayos de entrenamiento que la raza F344 (Kosten et al., 1997). Estos mismos autores sin embargo demostraron diez años más tarde que durante el mantenimiento, una vez que la conducta ya estaba adquirida, las ratas LEW se autoadministraban menos cocaína que las ratas F344 tanto bajo programas de razón fija como de razón progresiva (Therese A Kosten, Zhang, & Haile, 2007). Por otro lado, estudios más recientes de nuestro laboratorio han mostrado que si bien en las fases iniciales de la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína las ratas LEW muestran mayores tasas de respuesta, este efecto se normaliza en las sesiones posteriores y se observa que la

cantidad total de droga autoadministrada no difiere entre razas (Miguel Miguéns et al., 2013, 2015; Rivera et al., 2013; Selvas et al., 2015). De modo similar, la adquisición de la autoadministración intravenosa de morfina, ocurrió de manera más rápida en la raza LEW que en la F344 (Ambrosio, Goldberg, & Elmer, 1995) aún usando programas de razón progresiva (Martín et al., 1999). Ambas razas mostraron extinción de la conducta al ser sustituida la morfina por suero salino, sin que hubiera diferencias notables durante el curso de la misma (Sánchez-Cardoso et al., 2007, 2009). En contraste con la consistencia de estos datos, ninguna de las dos razas adquirió la conducta de autoadministración de nicotina bajo condiciones en las que otras razas de ratas sí la adquirieron (Shoaib et al., 1997). Es difícil explicar estos últimos resultados, especialmente si tenemos en cuenta que los estudios de condicionamiento preferencial al sitio demuestran que en la raza LEW sí se da condicionamiento de preferencia inducido por nicotina (a una dosis intermedia) aunque no sea el caso en la cepa F344 (Philibin et al., 2005). Es posible que las divergencias entre ambos modelos radiquen en aspectos metodológicos importantes como, por ejemplo que, administrada intravenosamente, la nicotina pueda tener ciertas propiedades aversivas a dosis no tan lejanas de las reforzantes.

Aunque los estudios de adquisición y mantenimiento de la conducta de autoadministración son importantes, estos no reflejan toda la complejidad del fenotipo adicto. Para intentar obtener datos más cercanos al cuadro adictivo en humanos, el grupo de la profesora Mary Jeanne Kreek de la Universidad Rockefeller en Nueva York, ha desarrollado un modelo de acceso extendido a la droga en el que los animales pueden ir modificando la dosis que reciben y escalando su conducta (Picetti, Ho, Butelman, & Kreek, 2010). Utilizando este modelo, los autores observaron que son las ratas LEW las que muestran una escalada consistente y una preferencia por las dosis más altas, mientras que las F344 prefirieron las dosis más bajas probadas. Estos resultados se observaron tanto con cocaína como con heroína (Picetti, Caccavo, Ho, &

Kreek, 2012; Picetti et al., 2010). Otros estudios sin embargo han demostrado que cuando se utilizan técnicas de economía conductual, en los que se modeliza el comportamiento de los animales a través de ecuaciones de demanda exponencial, las ratas F344 “defienden” (en los términos de la economía conductual) un consumo de cocaína mayor que las LEW cuando se introduce este reforzador, siendo la tendencia contraria con la comida, en la que las LEW defienden más este consumo. No obstante, en ambas cepas el consumo de comida siempre fue más defendido que el de cocaína (Christensen, Kohut, Handler, Silberberg, & Riley, 2009).

Existe un único estudio hasta la fecha relacionando la respuesta operante y el consumo de cannabinoides en estas razas y se ha realizado no mediante autoadministración sino determinando el cambio en los umbrales de refuerzo en ambas razas generado por la administración pasiva de THC. Los resultados de este estudio mostraron que el THC era capaz de afectar a los umbrales del refuerzo intracraneal en la cepa LEW pero no en la F344, confirmando la idea de que estas dos cepas también muestran sensibilidad diferente a los efectos de los cannabinoides (Lepore, Liu, Savage, Matalon, & Gardner, 1996).

Utilizando un reforzador natural como es la comida, en un programa de reforzamiento continuo, la raza LEW adquirió más rápidamente la respuesta operante que la F344, pero ninguna de las dos razas difirieron en el número de ensayos para alcanzar su respectivo nivel asintótico de respuesta (Kosten y Bombace, 2001). A su vez, bajo un programa de razón progresiva, ambas razas no mostraron diferencias significativas en los puntos de cese (“breaking points”) ni en la frecuencia final de respuestas emitidas para comida (Martin et al., 1999). Estos datos parecen, por tanto, indicar que el aumento en la adquisición de la respuesta operante para drogas, que es mayor en la raza Lewis comparada con la F344, no se debe a diferencias en la habilidad para aprender o ejecutar tareas operantes en general.

Podemos concluir por tanto que las ratas LEW tienen una mayor predisposición a mostrar un patrón de conducta adictivo, caracterizado por una adquisición más rápida de la conducta de autoadministración, una mayor condicionamiento de preferencia al lugar, mayor escalada y preferencia por dosis más altas, sin que estos resultados se deban a diferencias en las capacidades para adquirir una respuesta operante entre ambas cepas.

A nivel neuroquímico diversas características del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico difieren entre las razas LEW y F344. En primer lugar, los niveles de la enzima tirosina hidroxilasa (TH, mediadora de la síntesis de la dopamina) en el ATV de los animales F344 son menores que los de la raza LEW. Sin embargo, hay mayores niveles de TH en el NAcc de la raza F344 en comparación con los de la raza LEW (Beitner-Johnson et al., 1991; Guitart et al., 1992; Ortiz et al., 1996). También, la raza F344 muestra un mayor número de neuronas dopaminérgicas activas espontáneamente en el ATV, en comparación con la raza LEW. En línea con estos hallazgos, se ha comprobado que las ratas F344 tienen un mayor nivel basal extracelular de metabolitos de dopamina en el NAcc, aunque no hay diferencias en los niveles de este neurotransmisor entre ambas cepas (Camp et al., 1994; Strecker et al., 1995). Igualmente, se ha comprobado que las F344 son menos sensibles en su respuesta dopaminérgica a la cocaína y a la metanfetamina en el NAcc en comparación con la raza LEW y tienen un menor descenso en los metabolitos de la DA (Camp et al., 1994). Sin embargo, también se ha encontrado que los niveles de dopamina en el NAcc se incrementan en una mayor proporción en respuesta a la administración de cocaína en la raza F344. Además, hay una diferencia temporal en este efecto. Los niveles de dopamina están más elevados en las F344 entre los 10 y 40 minutos tras la administración, con un máximo de un 553% a los 30 minutos. Por el contrario, el máximo nivel de DA en las ratas Lewis aparece a los 20 minutos siendo éste de un 336%. Estas diferencias neuroquímicas en los niveles extracelulares de

dopamina también se extendieron a otras drogas como la morfina, y la anfetamina (C Cadoni & Di Chiara, 2007). En el caso de la heroína, el asunto es algo más complicado ya que si bien no se observaron diferencias entre razas en la respuesta dopaminérgica en el NAcc ante una inyección de heroína, cuando se pretrataron los animales con THC durante la adolescencia se observó una potenciación de la respuesta dopaminérgica, que en el caso del NAcc-Shell fue selectiva de la raza LEW (Cristina Cadoni et al., 2015).

Por otro lado, la raza F344 muestra niveles mayores de proteínas  $G_{i\alpha}$  en el NAcc, pero no hay diferencias con respecto a las  $G_{o\alpha}$  o  $G_{s\alpha}$ , en comparación con las ratas LEW (Brodkin et al., 1998; Guitart et al., 1993). Las proteínas  $G_i$  y  $G_o$  se unen a los receptores dopaminérgicos del subtipo  $D_2$  e inhiben la actividad de la enzima AC, por lo que los datos son consistentes con el hecho de que las F344 tengan menores niveles de AC y de proteína quinasa A (Guitart et al., 1993), y una mayor densidad de receptores dopaminérgicos del subtipo  $D_2$  o del  $D_3$  (Flores et al., 1998) que la raza LEW en el NAcc. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias entre ambas razas en los niveles de receptores dopaminérgicos del subtipo  $D_1$ . Otros autores tampoco han encontrado diferencias en la fijación a los receptores de subtipo  $D_1$  o del  $D_2$ , o en la expresión de su ARNm en el estriado (George et al., 1991; Luedtke et al., 1992), aunque nosotros sí hemos observado diferencias (LEW>F344) en los niveles de receptores  $D_2$  en la parte dorsal de dicha estructura y en la corteza piriforme y campo CA1 del hipocampo (F344>LEW) (Sánchez-Cardoso et al., 2009). Tampoco se han encontrado diferencias en la fijación al receptor  $D_1$  en el NAcc (Sánchez-Cardoso et al., 2009), pero sí se han descrito diferencias entre ambas razas en otras zonas cerebrales. Así, la raza F344 muestra mayores niveles de fijación al receptor del subtipo  $D_1$  en la corteza cingulada, tubérculo olfatorio y en la sustancia negra (Sánchez-Cardoso et al., 2009) y niveles menores en varias capas del hipocampo (capa *stratum radiatum* de CA1 y CA2; capa *lacunosum* molecular de CA1; capa de

células piramidales de CA3), en las capas molecular y granular del giro dentado, partes central y ventral del núcleo talámico posterolateral y la parte reticular de la sustancia negra (Martin et al., 2003). Por último, para terminar esta breve exposición de diferencias entre ambas cepas en el sistema dopaminérgico, cabe señalar que se ha descrito también que en el NAcc los niveles del transportador de dopamina (DAT) son menores en la raza Lewis que en la raza F344 (Flores et al., 1998).

También se han encontrado diferencias entre ambas razas en otros sistemas de neurotransmisores. Por ejemplo, comparada con la raza LEW, la F344 tiene un mayor nivel basal de glutamato en la corteza prefrontal (PFC) y en el NAcc (Selim y Bradberry, 1996). Sin embargo, la raza F344 tiene menor nivel de fijación al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) que la raza Lewis en varias regiones cerebrales como son la corteza frontal y cingulada, el CPu, el núcleo central de la amígdala y la capa blanca intermedia del colículo superior (Martin et al., 2003). No obstante, tras la extinción de la conducta de autoadministración de cocaína, no se encontraron diferencias entre razas en los niveles extracelulares de glutamato en el NAcc-Core (Miguel Miguéns et al., 2013)

Por otro lado, las ratas F344 tienen niveles basales de serotonina mayores en el NAcc comparadas con las ratas Lewis (Selim y Bradberry, 1996), aunque los niveles basales de su metabolito, 5- HIAA (ácido 5-hidroxi-Indolacético), no difieren entre ambas razas (Camp et al., 1994; Strecker et al., 1995). Sin embargo, los niveles de este metabolito se incrementan de manera notable en el NAcc de las ratas F344 y no en las LEW, en respuesta a la administración de metanfetamina pero no de cocaína (Camp et al., 1994). Además, las ratas F344 tienen mayores niveles de fijación al receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza frontal y en el hipocampo, pero no en el hipotálamo y se ha visto que la expresión de su ARNm es mayor en el hipocampo de las ratas F344 que en las ratas LEW. También la raza F344 tiene un mayor nivel de actividad de la enzima triptófano hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de

serotonina) (Chaouloff et al., 1995). En relación con la serotonina, se ha visto que la adrenalectomía causa un incremento en la densidad de los receptores serotoninérgicos en el hipotálamo e hipocampo de ambas razas.

Recientemente se ha estudiado el sistema opioide en las razas LEW y F344, centrándose en la posible influencia de diferencias en la funcionalidad de dicho sistema en relación con la distinta preferencia por drogas de abuso que exhiben ambas razas. A este respecto, los primeros resultados demostraron que la raza LEW adquiría la conducta de autoadministración de opiáceos (morfina) más rápidamente que la cepa Fischer 344 con programas de condicionamiento operante de bajo requerimiento de respuestas (Razón Fija 1; RF1) (Ambrosio et al., 1995). También se encontró que esas diferencias en la adquisición de la conducta de autoadministración de morfina se mantenían claramente con programas de alto requerimiento en el número de respuestas, como son los programas de Razón Progresiva, que miden la eficacia reforzante de las drogas (Martin et al., 1999). En este último trabajo se comprobó que la raza LEW no solamente se autoadministraba más morfina que la F344, sino que tenía un menor contenido de ARNm de proencefalina en el estriado dorsal y en el NAcc que la cepa F344.

Se han medido también los niveles basales de receptores  $\mu$ -opioides en ambas razas mediante autorradiografía, encontrando que la cepa LEW tiene menores niveles de estos receptores en el estriado dorsal, en el NAcc, en varios núcleos talámicos y otras regiones cerebrales, en comparación con la raza F344 (Sanchez-Cardoso et al., 2007). Otros autores también han encontrado que la raza F344 tiene un mayor nivel de expresión génica de la encefalina en el hipotálamo (Sternberg et al., 1989) y unos niveles mayores de dinorfinas en varias regiones del cerebro, comparado con la raza LEW (Valenza, Picetti, Yuferov, Butelman, & Kreek, 2016)(Nylander et al., 1995). Todos estos datos sugieren que ambas razas difieren en varias características del sistema opioide, aunque no sabemos cómo puede traducirse este hecho en

diferencias conductuales. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la raza LEW adquiere la conducta de autoadministración de morfina más rápidamente que la F344 (Ambrosio et al., 1995; Martin et al., 1999) y ello puede tener relación con una menor presencia basal de elementos reguladores de su sistema opioide (receptores  $\mu$  y niveles de proencefalina) comparada con la menos vulnerable cepa F344. Recientemente se ha observado también que los niveles de expresión génica de diferentes péptidos opioides en el estriado dorsal correlacionan con la conducta de autoadministración de cocaína en la raza F344 pero no en la LEW (Valenza et al., 2016) lo que añade validez al argumento del papel modulador de las diferencias genéticas en la función del sistema opioide sobre las conductas adictivas, en este caso, de adicción a cocaína.

Hasta la fecha no se disponía de datos sobre las posibles diferencias entre LEW y F344 en elementos del sistema endocannabinoide, lo cual constituye uno de los primeros objetivos de esta tesis doctoral. Se han observado diferencias tanto en los niveles de unión a receptores cannabinoides como en la expresión génica de diferentes elementos del citado sistema (Coria et al., 2014) lo cual se detallará convenientemente en la sección de resultados de la presente Tesis Doctoral.

Recientemente se ha investigado el sistema colecistoquininérgico en estas dos cepas encontrándose que las ratas F344 mostraban niveles superiores de colecistoquinina en microdializados obtenidos del NAcc. Además, se estudió la unión de colecistoquinina en cerebro total y se encontró que las ratas F344 tenían niveles mayores del receptor  $CCK_2$  que las ratas LEW. Los autores relacionaron estos datos con la influencia del sistema colecistoquininérgico en la vulnerabilidad a las acciones reforzantes de la morfina en estas cepas (Noble et al., 2012).

Un último tema a tratar sobre estas cepas es su capacidad de aprendizaje y memoria y en general de los procesos de plasticidad sináptica que muestran porque podrían estar relacionados directa o indirectamente con su diferente vulnerabilidad al

consumo de drogas. En este sentido se ha observado que las ratas F344 muestran un peor rendimiento en tareas de aprendizaje y memoria espaciales (A Fole, Martin, Morales, & Del Olmo, 2015; Alberto Fole et al., 2011; van der Staay et al., 2009). Además se ha visto que las ratas de la cepa F344 no muestran despotenciación de la LTP (*long-term potentiation*) (M Miguéns, Coria, Fole, Ambrosio, & Olmo, 2011) y tienen un déficit parcial en el fenómeno de la LTD (*long-term depression*) inducida por NMDA (NMDA-LTD) (A Fole et al., 2015). Por último, se han observado diferencias en la morfología de las neuronas hipocampales en estas cepas así como en la densidad de espinas dendríticas. Por ejemplo, se ha visto que las dendritas apicales del campo CA1 de las ratas LEW eran más ramificadas y tenían mayor complejidad que en las ratas F344, además las ratas F344 tenían una densidad de espinas dendríticas mayor que las ratas LEW (Miguel Miguéns et al., 2015), no obstante, el diámetro de las espinas sí era mayor en las ratas LEW comparadas con las F344 (Selvas et al., 2015).

## 2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

---

Teniendo en cuenta los datos expuestos en la introducción de la presente Tesis Doctoral, parece obvio que estas dos cepas de ratas difieren en una gran variedad de parámetros neuroquímicos y que muestran una vulnerabilidad diferencial al consumo de drogas psicoactivas. Dentro de toda la literatura revisada observamos no obstante que había un tema que requería mayor investigación y era el estudio del sistema cannabinoide endógeno en ambas cepas. Dada la estrecha relación que existe entre los sistemas opioide y cannabinoide endógenos y habida cuenta de las grandes diferencias que ambas cepas muestran en el sistema opioide endógeno (Herradón, Morales, & Alguacil, 2003; Martín et al., 1999; Sánchez-Cardoso et al., 2007), parecía probable que estas cepas también difirieran en el sistema endocannabinoide. Si esto fuera así, lo siguiente a comprobar sería si esta diferencia a nivel neuroquímico tiene algún tipo de relación con la conducta de autoadministración de cannabinoides, fenómenos que no se han explorado aún en estas cepas. Por otro lado, parecía probable también que la autoadministración de morfina, y la extinción de esta conducta, ya que afectan al sistema opioide endógeno y de manera diferencial en ambas cepas (Sánchez-Cardoso et al., 2007), tuvieran también algún efecto en el sistema endocannabinoide. Si esto fuera así, se podría plantear la posible utilidad de fármacos que modulan la actividad cannabinoide como terapia para las recaídas al consumo de opiáceos.

Por último, dada la profunda interrelación que existe entre las funciones del sistema inmune y del sistema nervioso, y las diferencias en este último sistema que existen entre ambas cepas, nos pareció interesante dar un primer paso en el estudio de la modulación de este sistema por la exposición a morfina en ambas cepas, así como en condiciones basales. Para ello realizamos las mismas mediciones de expresión génica que hicimos en encéfalo, en el bazo, por ser éste un órgano clave en la función inmune.

### 3. OBJETIVOS EXPERIMENTALES

---

Teniendo en cuenta lo expuesto en el Planteamiento de la Investigación, en la presente Tesis Doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos experimentales.

Objetivo general: Estudio del sistema endocannabinoide en las cepas de ratas Lewis y Fischer 344:

Objetivos Específicos:

- Estudiar los niveles de unión de receptores cannabinoides mediante estudios de autorradiografía cuantitativa con  $^3\text{H}$ -CP 55,940 en una amplia distribución de áreas encefálicas.

- Estudiar la expresión génica mediante qRT-PCR de las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides NAPE-PLD y FAAH (para la anadamida) y DAGL $\alpha$  y MAGL (para el 2-AG) en dos áreas claves del refuerzo y la conducta motivada como son el NAcc y la PFC.

- Estudiar la expresión génica de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2, así como del receptor putativo de cannabinoides GPR55 en dos áreas claves del refuerzo y la conducta motivada como son el NAcc y la PFC en condiciones basales.

- Determinar si las posibles diferencias que pudiéramos encontrar tendrían algún correlato funcional en la autoadministración de cannabinoides en ambas cepas.

- Estudiar el papel cruzado de los sistemas opioide y cannabinoide en ambas cepas, y para tal fin medir la expresión génica de los elementos endocannabinoides mencionados tras la autoadministración de morfina y la extinción de la misma tras dos intervalos temporales (7 y 15 días de extinción).

- Realizar estudios de expresión génica en el bazo de animales LEW y F344 como primer paso para estudiar la regulación del sistema endocannabinoide a nivel inmune y la influencia que la autoadministración de morfina o su extinción pudieran tener en esta regulación.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 4.1 Sujetos

Para la realización de todos los experimentos que componen esta tesis, ha sido necesario utilizar 199 ratas macho de las cepas LEW y F344 (LEW: n=98; F344: n=101) de un peso aproximado de 250-300 g. al comienzo de los experimentos. Teniendo en cuenta que 12 de los animales no superaron la cirugía, su distribución en las diferentes situaciones experimentales fue: 8 LEW y 8 F344 en el experimento de autorradiografía cuantitativa, 10 LEW y 9 F344 en el estudio de la expresión génica basal por qRT-PCR, 16 LEW y 19 F344 en el experimento de autoadministración de WIN 55,212-2 y 60 LEW y 57 F344 en el experimento de autoadministración de morfina. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad constantes en un ciclo de luz de 12 horas (encendido de luces a las 08:00 a.m.). Desde que los animales llegaron al animalario hasta el comienzo de los experimentos se los mantuvo con comida *ad libitum* y sin ser expuestos a ninguna situación experimental ni recibir ninguna sustancia psicoactiva. Seguimos las directrices de la norma europea 86/609/EEC en el uso y mantenimiento de estos animales. En todo momento se minimizó el número de animales empleados.

## 4.2 Autorradiografía de receptores cannabinoides

Las técnicas de autorradiografía de receptores se realizan sobre cortes de tejido, y consisten básicamente, en sumergir el tejido en una sustancia que contenga una molécula que se una al receptor a estudiar, que ha sido modificada añadiéndole un isótopo radioactivo, y exponiendo el tejido a una película fotográfica sensible a la radioactividad que emita el tejido así tratado.

La técnica de la autorradiografía cuantitativa se utiliza para obtener una medida del número de receptores que se expresan en el tejido a estudiar, de manera que se utiliza una molécula con alta afinidad por el receptor en cuestión (ya sea agonista o antagonista) a la que se le ha añadido un isótopo radioactivo (en nuestro estudio

Tritio). Ésta molécula tritiada se unirá a los receptores que queremos cuantificar, pero sabemos que también se une de manera inespecífica a otras moléculas. Para cuantificar esta unión inespecífica, sumergimos los cortes de tejido en una sustancia que contenga, además del agonista o antagonista tritiado, esa misma molécula afín al receptor (u otra molécula con al menos la misma afinidad), pero sin tritiar y en una mayor concentración (en nuestro caso en una concentración milimolar frente a una concentración nanomolar). Esa mayor concentración desplazará de los receptores la molécula tritiada de manera que la señal radiactiva que emitan los cortes así tratados corresponderá a la unión inespecífica. Restando esta unión inespecífica a la unión total, obtendremos una medida mucho más ajustada del número de receptores estudiados (unión específica).

Para los estudios autorradiográficos utilizamos ratas macho (280-300 g) LEW y F344 (Harlan Interfauna Ibérica) (8 por raza). A las dos semanas de su llegada al animalario, los animales fueron sacrificados mediante decapitación y sus cerebros se extrajeron y fueron sumergidos en 2-metilbutano enfriado con hielo seco. Posteriormente se obtuvieron cortes a 20 micras en un criostato y fueron colocados en pares sobre portas gelatinizados. Obtuvimos cortes en 7 niveles diferentes a lo largo de todo el encéfalo (ver Resultados).

Los receptores cannabinoides fueron marcados con el ligando radiactivo  $^3\text{H}$ -CP 55,940 con una actividad específica de 139,6 Ci/mmol (Perkin Elmer Life Sciences, Madrid, España.). El protocolo, basado en trabajos previos de Fattore y cols. (Fattore et al., 2007), constaba de una serie de incubaciones y lavados. En primer lugar los portas fueron incubados a 37°C durante 150 minutos en tampón 50 mM Tris-HCl con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) y 10 nM de  $^3\text{H}$ -CP 55,940 (pH 7,4). La unión no específica se determinó en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de CP 55,940 no radioactivo. Una vez terminado el período de incubación, los portas se lavaron en el mismo tampón con 1% de BSA durante 60 minutos a 4°C, y a continuación se lavaron de nuevo durante 180

minutos en distintas cubetas con las mismas condiciones del lavado anterior. Posteriormente, los portas se sumergieron en el mismo tampón pero sin BSA, en frío durante 5 minutos, y después en agua destilada. Por último, se procedió al secado de los portas con aire frío.

Los portas ya tratados se expusieron junto con patrones de radiactividad comercialmente disponibles (Autoradiographic  $^3\text{H}$  micro-scales, (Amersham Internacional/Pharmacia Biotech, Amersham, Reino Unido) a películas sensibles al tritio ( $^3\text{H}$ -Hyperfilm, General Electrics Health Care, España) durante 6 semanas a una temperatura entre  $4^{\circ}$  y  $7^{\circ}\text{C}$ . Las películas se revelaron con revelador Kodak D19.

#### 4.2.1. Análisis cuantitativo de los autorradiogramas

Una vez obtenidos los autorradiogramas, se cuantificaron mediante un densitómetro, empleando una aplicación desarrollada por el NIH (National Institute of Health) y comercializada por Scion Corporation (EEUU). Para la captura de imágenes se empleó una cámara digital que se conectó mediante una tarjeta gráfica SCION a un ordenador compatible IBM. Mediante el lenguaje incluido en la propia aplicación SCION, se programó el procedimiento para la captura y análisis de los autorradiogramas y el posterior almacenamiento de los datos.

Todas las imágenes capturadas de la misma película fueron corregidas mediante una rutina de código que iguala la iluminación (contraste y brillo) de la imagen autorradiográfica a un fondo blanco homogéneamente iluminado. Previamente a la captura de las imágenes de los cortes de tejido, se digitalizó la imagen del patrón y se construyó una curva de calibrado de orden cuadrático para disponer de medidas comparables entre las diferentes películas y para poder obtener medidas absolutas.

Después de capturar las imágenes se realizó con el mismo programa la cuantificación en las diferentes regiones estudiadas y los resultados fueron almacenados en una base de datos para su posterior análisis y tratamiento estadístico.

### **4.3 Autoadministración intravenosa de drogas**

#### **4.3.1. Introducción a la autoadministración intravenosa de drogas**

Nichols y cols. llevaron a cabo en 1956 los primeros estudios experimentales que sugirieron una posible función de las drogas como reforzadores en animales. Posteriormente, en 1962, James Weeks estableció la metodología de la autoadministración intravenosa de drogas tal y como la conocemos en la actualidad (Weeks, 1962). La aportación de J. Weeks fue importante porque permitió establecer los procedimientos de condicionamiento operante que posibilitaban la demostración de que las drogas actuaban como reforzadores positivos. Este autor fue el primero que implantó catéteres de forma permanente en la vena yugular de ratas de laboratorio a las que conectó a una caja de condicionamiento operante y a una bomba de infusión que dispensaba automáticamente inyecciones de morfina, comprobando que los animales se inyectaban cantidades importantes de esta droga. Esta técnica superó los problemas debidos al sabor de las disoluciones de los fármacos y al retraso en el refuerzo, propios de la vía oral empleada por otros autores, permitiendo el establecimiento de respuestas operantes claramente definidas y de programas de reforzamiento. Este procedimiento fue aplicado en otros laboratorios, con otras especies de animales y diferentes drogas, como la anfetamina y la cocaína, obteniéndose resultados parecidos (Pickens y Thompson, 1968; Thompson y Schuster, 1964). De esta forma se demostró la gran influencia que ejercen las drogas sobre la conducta. La obtención de resultados similares por parte de otros grupos de investigación propició que esta metodología fuese ampliamente utilizada en diferentes especies de animales para estudiar los efectos reforzantes de las drogas de abuso.

Las sesiones de autoadministración programadas dependen del criterio del investigador y de las características específicas de la droga a autoadministrar, y normalmente están limitadas en cuanto a su duración. En nuestros experimentos de autoadministración de WIN 55,212-2 se programaron sesiones de una hora durante la adquisición de la conducta, y de dos horas durante el mantenimiento y la extinción, que es el intervalo temporal medio utilizado en gran parte de los estudios realizados con autoadministración de sustancias adictivas cuando el programa consta de un gran número de sesiones, sin embargo, en nuestros experimentos de autoadministración de morfina todas las sesiones tuvieron una duración de doce horas y se realizaron por la noche, en el periodo de mayor actividad de las ratas. En general, el comportamiento del animal durante las primeras sesiones es bastante desorganizado y conforme avanzan las sesiones, los animales van regulando el número de inyecciones que se autoadministran. Así, cuando los animales inician una sesión, suelen autoadministrarse varias inyecciones en los primeros minutos para, posteriormente, ir espaciándolas en el tiempo de forma regular.

La dosis parece ser la variable más importante a la hora de regular la autoadministración de drogas. Partiendo de unos niveles mínimos, las dosis más bajas tienden a aumentar el número de inyecciones autoadministradas y las dosis altas tienden a disminuirlas. Cuando los animales han sido sometidos a varias sesiones, generalmente, después de cada inyección, hay un intervalo temporal en el que el animal no se autoadministra más droga (pausa post-refuerzo) y este intervalo temporal se encuentra directamente relacionado con la dosis. Cuanto más alta es la dosis, más se alarga la pausa y en consecuencia, el animal se autoadministra un menor número de inyecciones durante la sesión. Se ha sugerido que la pausa post-refuerzo puede deberse a una alteración comportamental generalizada a causa de la cual el animal deja de responder por un tiempo. Por otro lado, se sabe que los efectos aversivos de las drogas también pueden limitar la tasa de autoadministración, lo que puede servir de

base para establecer las dosis de droga que se deberían emplear con distintos programas de autoadministración (Yokel y Piekens, 1974).

#### 4.3.2. Equipos utilizados en la administración intravenosa de drogas

En los estudios de autoadministración de drogas empleamos 18 cajas de condicionamiento operante (Figura 9) (Med Associates, Vermont, EE.UU. y Coulburn Instruments, Holliston, EE.UU.). En cada caja se colocaron dos palancas situadas a ambos lados de una de las paredes de la caja y separadas entre sí 14 cm. Las palancas estaban diseñadas para registrar cada respuesta que se produjera cuando se aplicaban al menos 3 g. de fuerza sobre ellas. La dispensación de las drogas se realizó mediante una bomba automática de infusión (Harvard Instruments; EEUU) que se encontraba situada fuera de la caja de condicionamiento operante. La bomba estaba conectada mediante un pivote giratorio de doble canal (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) al catéter, que discurría por el interior de un muelle metálico (Alice King Chatman; EEUU) y que se encontraba acoplado a su vez al conector previamente colocado en el cráneo del animal. El registro de los datos y el

control de las cajas y de la bomba se realizó mediante un ordenador compatible IBM y una interfaz (Med Associates; EE.UU.).



**Figura 9. Sistema de autoadministración intravenosa de drogas (Med-Associates).** Se puede observar la bomba de infusión, el dispensador de bolitas de comida, y la luz que al encenderse hará de estímulo discriminativo. Las palancas en esta imagen se encuentran retraídas.

#### 4.3.3. Técnica quirúrgica

A los animales, previamente anestesiados con Ketamina (40 mg/kg) y Diazepán

(10 mg/kg), se les implantaron quirúrgicamente catéteres permanentes en la vena yugular. En primer lugar se hizo un pequeño corte en la piel del cuello del animal hasta llegar al paquete vascular aislando la vena yugular. Posteriormente, se hizo una pequeña incisión en la vena y se insertó el catéter, que se fijó a la propia vena y a los músculos pectoral y maxilofacial mediante suturas. Una vez fijado el catéter, éste se extrajo por la espalda del animal a la altura media escapular, imposibilitando así que pudiera llegar hasta él y dañarlo. Finalmente, se suturó la zona y se comprobó que la posición del catéter era la correcta y que no existía pérdida o bloqueo del flujo a través del mismo mediante la infusión de suero salino.

Los animales permanecieron al menos 7 días en recuperación antes del comienzo de los experimentos y se les administró diariamente, a través del catéter, una solución de suero salino con 100 U.I./ml de Heparina y Gentamicina (1mg/ml), con el fin de evitar su oclusión y posibles infecciones. El día previo al comienzo de la autoadministración, se comprobó el correcto funcionamiento de los catéteres mediante la infusión de un bolo de 0,2 ml aproximadamente de tiopental sódico (20 mg/ml). Se consideró que el catéter funcionaba correctamente si se observaban signos de aturdimiento o pérdida de consciencia claros justo después de la infusión del bolo.

#### 4.3.4. Compuestos empleados en la autoadministración

En los experimentos de autoadministración de cannabinoides, el agonista cannabinoide empleado fue el WIN 55,512-2 (Tocris, Reino Unido), a una dosis de 12,5 µg/kg, disuelto en Tween80 al 0,3% (Sigma, España) y suero salino estéril (0,9% NaCl). El antagonista cannabinoide específico de los receptores CB1 utilizado en la sesión 21, fase de mantenimiento, fue el AM251 (Tocris, Reino Unido) a una dosis de 4 mg/kg i.p. disuelto en una mezcla de Tween80, dimetilsulfóxido y suero salino estéril en una proporción 1:1:8.

En los experimentos de autoadministración de opiáceos, el agonista opioide empleado fue la morfina, a una dosis de 1mg/kg, disuelto en suero salino estéril (0,9% NaCl).

#### 4.3.5. Procedimiento experimental

Para la realización de esta tesis, ha sido necesario realizar dos estudios basados en el paradigma de autoadministración intravenosa de drogas: uno de autoadministración de cannabinoides, y otro de autoadministración de opiáceos. Como podrá comprobarse, ambos difieren en muchos aspectos procedimentales debido, fundamentalmente, a las características intrínsecas de las sustancias a autoadministrar (WIN 55,212-2 y morfina) y a la experiencia previa de autoadministración intravenosa en ratas de la sustancia en cuestión (mientras que la autoadministración de cannabinoides se ha conseguido en muy escasas ocasiones y nunca con estas cepas de rata, la autoadministración de morfina en LEW y F344 es el prototipo del modelo de vulnerabilidad/resistencia a la autoadministración de sustancias adictivas). En lo que ambos estudios coinciden plenamente es en el tratamiento previo a la autoadministración propiamente dicha. En ambos casos, los machos de rata LEW y F344 una vez aclimatados al animalario, alcanzado el criterio de peso y previo a la cirugía, fueron entrenados a presionar la palanca en las cajas de condicionamiento operante con un programa de razón fija 1 (RF1) reforzado con comida. Una vez alcanzado el criterio de eficacia (3 sesiones consecutivas de media hora con al menos 100 presiones de palanca), los animales estuvieron listos para la cirugía y tras una semana de recuperación comenzaron la autoadministración intravenosa de drogas.

En el estudio de autoadministración de cannabinoides, ratas macho de las cepas LEW y F344 fueron sometidas a la autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 mediante un programa de razón fija 1 (RF1), de manera que recibieron una dosis de 12,5 µg/kg del agonista cannabinoide de forma contingente a cada presión de

la palanca operativa, con un tiempo de infusión de 15 segundos, siempre seguido de un intervalo de tiempo fuera de otros 15 segundos en los que la presión de la palanca activa se registraba (como presión en tiempo fuera), pero no tenía asociada consecuencia alguna.

El programa constó de 28 sesiones divididas en tres fases:

- *Adquisición*: sesiones de la 1 a la 8.
- *Mantenimiento*: sesiones de la 9 a la 23.
- *Extinción*: sesiones de la 24 a la 28.

Un día antes de comenzar las sesiones de adquisición, se les retiró la comida, y se les mantuvo a dieta (11-14 g.) durante todo el experimento de autoadministración, controlándoles el peso diariamente, media hora antes de cada sesión en las cajas de autoadministración, de manera que se mantuvieran entre el 90 y el 95% de su *peso ad libitum*.

Las sesiones de adquisición tuvieron una duración de 1 hora cada una, y los dos primeros días (sesiones 1 y 2) se colocaron dos pellets en la palanca activa para facilitar la adquisición de la conducta y el contacto con la droga. La duración de cada una de las sesiones del resto del programa, en las fases de mantenimiento y extinción, fue de 2 horas.

En las sesiones 19 y 20 (sesiones 11 y 12 de la fase de mantenimiento), media hora antes del comienzo de la sesión se les administró a través de una inyección intraperitoneal (i.p.) 1 ml/kg de vehículo del antagonista cannabinoide, para acostumbrar a los animales al procedimiento de inyección y eliminar posibles efectos derivados del estrés de dicho procedimiento. En la sesión 21 (sesión 13 de la fase de mantenimiento) se les administró 4 mg/ml/kg i.p. de AM251.

Durante las sesiones de la fase de extinción (sesiones 24-28) los animales se autoadministraron con cada presión de palanca 100 µl de vehículo de WIN 55,212-2 en 15 segundos de infusión.

En el estudio de autoadministración de opiáceos, ratas macho de las cepas LEW y F344 fueron sometidas a la autoadministración intravenosa de morfina mediante un programa de razón fija 1 (RF1), de manera que recibieron una dosis de 1 mg/kg del agonista opioide de forma contingente a cada presión de la palanca operativa.

El programa constó de 34 sesiones divididas en dos fases:

- *Autoadministración*: sesiones de la 1 a la 19.
- *Extinción*: sesiones de la 20 a la 34.

Todas las sesiones de este estudio tuvieron una duración de 12 horas y se realizaron por la noche (de 20 a 8 horas) en el periodo de máxima actividad de las ratas. Esto es lo lógico si tenemos en cuenta que nuestra variable dependiente es una conducta operante (presiones de palanca) y que el efecto principal de la droga (morfina) es relajante.

Durante la fase de extinción se sustituyó la morfina por su vehículo, de manera que contingentemente a cada presión de palanca activa las ratas obtuvieron una inyección de 100 µl de suero salino estéril (0,9% NaCl).

El tiempo de infusión fue de 10 segundos durante todo el estudio, seguido por un tiempo fuera de otros 10 segundos en los que la presión de la palanca activa se registraba (como presión en tiempo fuera) pero no tenía asociada consecuencia alguna.

Cada sesión de autoadministración tuvo un tope máximo de 50 inyecciones.

## 4.4 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa –qPCR-

### 4.4.1. Introducción a la qPCR

Desde que Kary Mullis ideara esta técnica a mediados de los ochenta del pasado siglo, la PCR ha contribuido al desarrollo de las ciencias biológicas más que cualquier otra técnica ideada en el siglo XX. El gran éxito de la reacción en cadena de la polimerasa se basa en que permite obtener un gran número de copias de fragmentos concretos de ADN utilizando básicamente los mismos mecanismos que utilizan las células de manera natural para replicar su material genético.

Tal y como describieron Watson y colaboradores en 1992, la técnica de la PCR consiste básicamente en la repetición cíclica de tres pasos:

- 1.- Desnaturalización del ADN bicatenario: La separación de las dos hebras de ADN se consigue calentando la muestra a temperaturas superiores a 90°C.
- 2.- Unión específica de los cebadores: Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos diseñados para delimitar la sección concreta de ADN que se quiere replicar. Se suelen emplear dos cebadores que se unen a cada una de las cadenas complementarias. La temperatura a la que se realiza la unión del cebador con el ADN monocatenario se denomina  $T_a$  (annealing temperature), depende de la composición concreta de bases y del tamaño del cebador y es crucial para comprobar la especificidad de la reacción.
- 3.- Extensión de la copia de ADN: La ADN polimerasa a partir de los cebadores y utilizando los nucleótidos presentes en la solución, replica la sección de ADN seleccionada.

Así, una vez completados los tres pasos de cada ciclo, se obtiene el doble de secuencias de ADN que delimitaron los cebadores, incrementándose el ADN seleccionado de manera exponencial, de manera que después de  $n$  ciclos obtendremos  $2^n$  copias.

En nuestros experimentos, como lo que queremos es cuantificar la cantidad de ARN mensajero, debemos añadir un paso previo: la retrotranscripción para pasar de ARN a ADN.

#### 4.4.2. Protocolo de qRT-PCR realizado

Han sido dos los experimentos en los que hemos investigado la expresión génica de parámetros del sistema endocannabinoide utilizando esta técnica: Uno basal y utilizando una muestra pequeña (19 ratas), y otro con las ratas del experimento de autoadministración de morfina con una muestra mucho mayor (102 ratas). Mientras en el estudio de la expresión génica basal extrajimos el ARN mediante un kit comercial y realizamos la amplificación mediante sonda y utilizando actina como gen de referencia, en el estudio sobre la influencia de la autoadministración de morfina, movidos principalmente por criterios de ahorro, extrajimos el ARN mediante la homogeneización del tejido en Qiazol –reactivo similar al Trizol- (Qiagen) y separación de fases y amplificamos utilizando SYBR Green y GAPDH como gen de referencia.

Para obtener las muestras de tejido las ratas fueron decapitadas y extraídos sus cerebros, y, en el caso de las ratas del experimento de autoadministración de morfina, también se tomaron muestras de bazo. Las disecciones fueron realizadas en el menor tiempo posible, sobre hielo y ayudados por una matriz cerebral. Las muestras así extraídas se preservaron en RNA later (Qiagen, UK) a una temperatura de 4°C durante 24 horas, para posteriormente ser almacenadas a -70°C hasta su procesamiento. Todo este proceso fue realizado con la máxima esterilidad y todo el instrumental, así como las superficies de trabajo, fue rociado con RNase Zap (Ambion/Life Technologies, USA) para prevenir la actividad de las ARNasas.

Para la homogeneización de las muestras utilizamos tampón Q: en agua DEPC (Sigma-Aldich, D5758) al 0,1%, autoclavada, sacarosa 320mM, HEPES (Calbiochem, 391338) 50mM, cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Complete EDTA-free, 11-873-

580-001), cocktail inhibidor de fosfatasa (Roche, PhosSTOP, 04-906-837-001) y butirato de sodio (Sigma-Aldrich B5887) 5mM, pH 7,8. En 20 volúmenes de este tampón, homogeneizamos las muestras con un mortero plástico (pellet pestle, Sigma-Aldrich, Z359971-1EA), las dejamos incubar en hielo picado durante 10 minutos y separamos por centrifugación (a 1000g, a 4° C, durante 10 minutos) la fracción citoplasmática, que almacenamos en QIAzol (Qiagen, 79306) para la posterior extracción de ARN.

La extracción del ARN de las muestras de tejido en el experimento sobre la expresión génica basal, se llevó a cabo utilizando un kit comercial de extracción en columna (RNAeasy extraction kit, Qiagen, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el experimento con las muestras de las ratas de autoadministración de morfina, extrajimos el ARN adaptando el protocolo que Chomczynski y Sacchi publicaron en 1987. Cogimos 80 µL de la fracción citoplasmática que reservamos, le añadimos 800 µL de QIAzol y lo dejamos incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para desestabilizar los complejos nucleoproteicos. Añadimos 160 µL de cloroformo (Merck, 1.02445.2500), agitamos manualmente durante 15 segundos y dejamos incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugamos a 12.000 g, a 4° C durante 15 minutos para obtener 3 fases de decantación. Trasvasamos la fase superior (fase acuosa), donde se encuentra el ARN disuelto, a un tubo eppendorf de 1,5 ml, le añadimos 400 µL de isopropanol (Fisher Scientific, BP2618) y 10 µL de glucógeno como *carrier* de precipitación, y centrifugamos a 12.000 g, a 4° C durante 10 minutos. Descartamos el sobrenadante y lavamos el pellet dos veces en 1ml de etanol al 75% frío (-20° C) centrifugándolo durante 5 minutos a 7.500 g, 4°C y descartando el sobrenadante. Dejamos secar al aire, a temperatura ambiente, durante 2-3 minutos para que se evapore todo el etanol y resuspendimos el pellet en 30 µL de agua-DEPC.

El ARN fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm y su integridad fue determinada con un bioanalizador Agilent Bioanalyzer 2100 (RNA Nano 6000 kit). Todas las muestras tuvieron una integridad con un RIN superior a 8.

Antes de realizar la retrotranscripción tratamos las muestras con DNasa I (Invitrogen, 18068-015) para eliminar la posible contaminación de ADN nuclear.

De cada estructura de interés, retrotranscribimos 150 ng de ARN usando iScript Super mix retrotranscription kit (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Las muestras de ADN complementario así obtenidas fueron diluidas en una proporción 1:2 en agua DEPC.

Las PCRs propiamente dichas, en el experimento sobre la expresión génica basal, fueron realizadas por triplicado con SSoFastProbes reaction mix (Bio-Rad; Hercules, CA, USA), utilizando placas blancas de 96 pocillos (Bio-Rad, Hard-Shell PCR Plates 96-well WHT/WHT, HSP9655) selladas con una película adhesiva (BioScience, Sorenson ultraA Seal, 36590), en un termociclador CFX 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bajo las condiciones térmicas recomendadas (desnaturalización inicial a 95°C durante 30 segundos, y posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y acoplamiento-extensión –a la temperatura indicada en la tabla 2- durante 10 segundos). Los detalles sobre cada reacción concreta y de la secuencia de los cebadores y las sondas los recogemos en la tabla 2.

**Tabla 2:** Cebadores y sondas utilizados para estudiar la expresión génica basal.

Gen	Oligo	T. D.	Secuencia
CB1	Sentido	60° C	GTCGATCCTAGATGGCCTTGC
	Antisentido		GTCATTCGAGCCCACGTAGAG
	Sonda		[HEX]ACCACCTTCCGTACCATCACCACAGACC[BHQ1]
GPR55	Sentido	60,5° C	GGGATACAAGTGCTTCCACA
	Antisentido		AAAGGAGACCACGAAGACGA
	Sonda		[HEX]TCCTCCTTCCATGGGCATCATGGGTC[BHQ1]
NAPE-PLD	Sentido	60° C	AGATATGGACTCAAGAGTGAAGACTTC
	Antisentido		TCCTCAAAGGCTTTGTCATCGG
	Sonda		[HEX]TTCAAGTATCGTGACTCTCCGTGCTTCAGG[BHQ1]
FAAH	Sentido	60° C	GTTACAGAGTGGAGAGCTGTCC
	Antisentido		GTCTCACAGTCGGTCAGATAGG
	Sonda		[HEX]CACGCAGTTGGTCCCTTTGTTCACTTCCC[BHQ1]
DAGL	Sentido	60° C	CTTTGCTGAATTTTTCCGTGACC
	Antisentido		TTGTTTGCCTCATCCAGCAC
	Sonda		[HEX]CGACATAGTGCCCTCCGACATCATTGCTG[BHQ1]
MAGL	Sentido	60° C	CTACCTGCTCATGGAATC
	Antisentido		GACACCCACGTATTTATTTTC
	Sonda		[HEX]ACACTCAAGATGTATGAAGGTGCCTAC[BHQ1]
Actina	Sentido	60° C	GCATCCTGACCCTGAAGTACCC
	Antisentido		GTGTTGAAGGTCTCAAACATGATCTGG
	Sonda		[6FAM]TGAACACGGCATTGTACCAACTGGGACGA[BHQ1]

Como comentamos al principio del epígrafe, las PCRs con las muestras de los animales del experimento de autoadministración de morfina las realizamos utilizando SYBR Green (Bio-Rad, SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 172-5272) como fluoróforo de detección. Las placas para las muestras, las películas de sellado y el termociclador fueron los mismos en ambos experimentos. El protocolo térmico consistió en 5 minutos a 95° C para activar la polimerasa y 40 ciclos de 5 minutos a 95°C y 30 segundos a 60°C con una curva de fusión de 60°C a 95°C. Mostramos los detalles sobre la secuencia de los cebadores utilizados en la tabla 3.

**Tabla 3:** Cebadores utilizados para estudiar la expresión génica en los sujetos del experimento de autoadministración de morfina.

Gen	Oligo	Temperatura Desnaturalización	Secuencia
CB1	Sentido	66,9° C	GTCGATCCTAGATGGCCTTGC
	Antisentido	65,8° C	GTCATTCGAGCCCACGTAGAG
CB2	Sentido	66,2° C	TATGCTGGTTCCCTGCACTG
	Antisentido	67,1° C	GGGGCTTCTTCTTTCCCTC
GPR55	Sentido	64,1° C	ACGGGAGTGTCTTCACCATC
	Antisentido	64,0° C	CACTCCCCTGTGGAAAGTGT
NAPE-PLD	Sentido	65,2° C	ACCAACATGCTGACCCAGAG
	Antisentido	64,5° C	ATCGTGACTIONCTCCGTGCTTC
FAAH	Sentido	61,9° C	GTTACAGAGTGGAGAGCTGTCC
	Antisentido	62,7° C	GTCTCACAGTCGGTCAGATAGG
DAGL	Sentido	67,3° C	CTTTGCTGAATTTTCCGTGACC
	Antisentido	66,1° C	TTGTTTGCCTCATCCAGCAC
MAGL	Sentido	55,4° C	CTACCTGCTCATGGAATC
	Antisentido	55,9° C	GACACCCACGTATTTATTTTC
GAPDH	Sentido	52,2° C	TCCCTGTTCTAGAGACAG
	Antisentido	54,2° C	CCACTTTGTCACAAGAGA

La eficiencia de la reacción fue optimizada con curvas estándar de diluciones seriadas. Los genes de referencia, de  $\beta$ -actina en el primer experimento y de GAPDH en el segundo, permanecieron estables en los distintos sujetos y grupos de los experimentos, confirmándose de este modo como genes de referencia óptimos para nuestras condiciones experimentales. Los ratios de expresión fueron calculados utilizando el software qBASE (Biogazelle, Ghent, Belgium) usando el método  $\Delta\Delta C_t$  con corrección de eficiencia.

## 4.5 Análisis estadístico

En los dos estudios realizados sobre parámetros basales, la autorradiografía de receptores y la expresión génica basal a través de PCR, utilizamos como estadístico la *t* de Student para detectar diferencias entre las razas en los parámetros analizados. En los casos en que las varianzas no fueron homogéneas, utilizamos la versión corregida del *t-test* proporcionada por el SPSS. Utilizamos el test de Grubbs para detectar *outliers* y excluirlos de los subsecuentes análisis. Para estimar el tamaño del efecto utilizamos el índice *r* y, en concordancia con Cohen (1992) consideramos un tamaño del efecto grande cuando *r* toma un valor superior a 0,5.

Para realizar el análisis de la conducta de autoadministración de drogas, en el estudio de autoadministración de WIN 55,212-2, utilizamos un ANOVA de medidas repetidas en cada una de las fases estudiadas (Adquisición, Mantenimiento, Extinción) con el factor intrasujeto SESIÓN y el factor intersujetos RAZA (con dos niveles: LEW y F344), para estudiar el efecto de la raza a lo largo de las diferentes fases del estudio de autoadministración. Para analizar las diferencias entre el número de presiones en la palanca activa y la inactiva en cada raza, promediamos el número total de presiones en cada palanca a lo largo de todas las sesiones de cada fase y realizamos una prueba *t* de Student para muestras independientes. El análisis del efecto del antagonista se realizó comparando las presiones en la palanca activa en el día anterior a la inyección y en el día de la administración del antagonista, mediante una prueba *t* de Student para muestras relacionadas. Seguimos un procedimiento idéntico para el análisis del efecto del antagonista sobre el número de presiones en la palanca inactiva.

El análisis de la conducta de autoadministración de morfina también se realizó mediante un ANOVA de medidas repetidas para cada una de las fases estudiadas (autoadministración, extinción de siete días y extinción de 15 días) con un factor

intrasujeto, SESIÓN, y como factores intersujetos RAZA (LEW y F344), TRATAMIENTO (salino y morfina) y EXTINCIÓN (extinción 0 o autoadministración, extinción 7 y extinción 15).

En el análisis de los resultados de la PCR en tiempo real con las muestras de las ratas del experimento de autoadministración de morfina, utilizamos un ANOVA para cada uno de los genes estudiados en cada una de las estructuras analizadas, con tres factores intersujetos, RAZA, TRATAMIENTO Y EXTINCIÓN, cada uno con los valores ya comentados en el análisis de la conducta. Cuando no se daban las condiciones de homogeneidad de varianzas exigidas, realizamos dos transformaciones de variables: logaritmo en base 10 y raíz cuadrada. Si continuaba sin existir homocedasticidad, los estadísticos no paramétricos utilizados fueron Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, ambos para muestras independientes.

En todos los análisis realizados, la significación estadística se fijó en  $\alpha=0.05$  y todos los cálculos se hicieron con SPSS 19.0.

## 5. RESULTADOS

---

## 5.1. Resultados: autorradiografía cuantitativa de receptores de cannabinoides.

El primer paso en nuestra investigación consistió en realizar un mapeo de los receptores de cannabinoides, tomando muestras de tejido a distintos niveles del encéfalo, y sometiénolas a un experimento de autorradiografía cuantitativa. En la Tablas 4 y 5 aparecen los valores de la unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  a los receptores de cannabinoides expresados en nCi/mg de tejido equivalente.

**Tabla 4: Unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  a receptores de cannabinoides en distintas regiones cerebrales en ratas LEW y F344.** En la tabla se muestra la media  $\pm$  el error estándar de la unión a receptores de cannabinoides, expresada en nCi/mg de tejido equivalente, y su significación estadística.

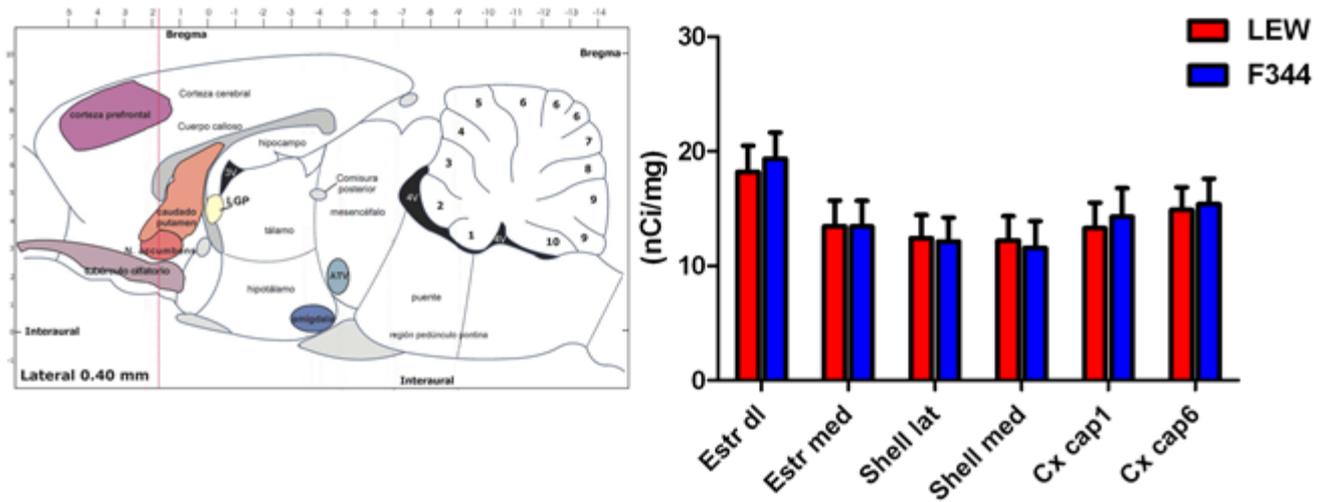
Región	Grupo		Significación estadística
	LEW	F344	
<b>Cerebro anterior (Bregma +1,70)</b>			
Estriado Dorsolateral	18,21 $\pm$ 2,28	19,37 $\pm$ 2,28	N.S. $t_{10}=0,36$ ; $p=0,727$
Estriado medial	13,45 $\pm$ 2,25	13,43 $\pm$ 2,27	N.S. $t_{10}=0,01$ ; $p=0,994$
NAcc Shell lateral	12,40 $\pm$ 2,03	12,13 $\pm$ 2,08	N.S. $t_{10}=0,10$ ; $p=0,927$
NAcc Shell med	12,21 $\pm$ 2,13	11,56 $\pm$ 2,35	N.S. $t_9=0,21$ ; $p=0,842$
Corteza motora capa1	13,28 $\pm$ 2,24	14,29 $\pm$ 2,50	N.S. $t_{10}=0,30$ ; $p=0,770$
Corteza motora capa6	14,89 $\pm$ 1,97	15,39 $\pm$ 2,21	N.S. $t_{10}=0,17$ ; $p=0,869$
<b>Núcleos Septales (Bregma - 0,30)</b>			
Estriado Dorsolateral	20,65 $\pm$ 0,79	20,19 $\pm$ 0,76	N.S. $t_{12}=0,41$ ; $p=0,687$
Estriado medial	13,43 $\pm$ 0,50	14,32 $\pm$ 0,67	N.S. $t_{12}=1,09$ ; $p=0,298$
Globo Pálido Lateral	20,94 $\pm$ 0,52	25,05 $\pm$ 0,33	*** $t_{10}=6,05$ ; $p<0,001$
Núcleo Septal Lateral	16,73 $\pm$ 0,59	16,85 $\pm$ 0,87	N.S. $t_{11}=0,11$ ; $p=0,912$
Corteza motora capa1	15,06 $\pm$ 0,77	15,88 $\pm$ 0,61	N.S. $t_{12}=0,79$ ; $p=0,443$
Corteza motora capa6	16,75 $\pm$ 0,61	16,99 $\pm$ 0,70	N.S. $t_{12}=0,25$ ; $p=0,806$
<b>Hipocampo (Bregma - 2,80)</b>			
Ca1	19,76 $\pm$ 1,75	19,53 $\pm$ 1,94	N.S. $t_{10}=0,09$ ; $p=0,933$
Ca2	19,74 $\pm$ 2,03	20,39 $\pm$ 1,89	N.S. $t_{10}=0,31$ ; $p=0,765$
Ca3	19,46 $\pm$ 1,91	20,29 $\pm$ 2,04	N.S. $t_{10}=0,30$ ; $p=0,771$
Giro Dentado	19,71 $\pm$ 1,91	20,70 $\pm$ 1,78	N.S. $t_{10}=0,38$ ; $p=0,712$
Globo Pálido Medial	23,45 $\pm$ 1,20	22,19 $\pm$ 1,83	N.S. $t_{10}=0,58$ ; $p=0,577$
Amígdala Basolateral	14,09 $\pm$ 1,59	13,14 $\pm$ 1,61	N.S. $t_{10}=0,42$ ; $p=0,683$
Corteza motora capa1	14,28 $\pm$ 1,87	14,00 $\pm$ 1,70	N.S. $t_{10}=0,11$ ; $p=0,912$
Corteza motora capa6	16,07 $\pm$ 1,48	15,97 $\pm$ 1,74	N.S. $t_{10}=0,05$ ; $p=0,965$

**Tabla 5: Unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  a receptores cannabinoides en distintas regiones cerebrales en ratas LEW y F344.** En la tabla se muestra la media  $\pm$  el error estándar de la unión a receptores de cannabinoides, expresada en nCi/mg de tejido equivalente, y su significación estadística.

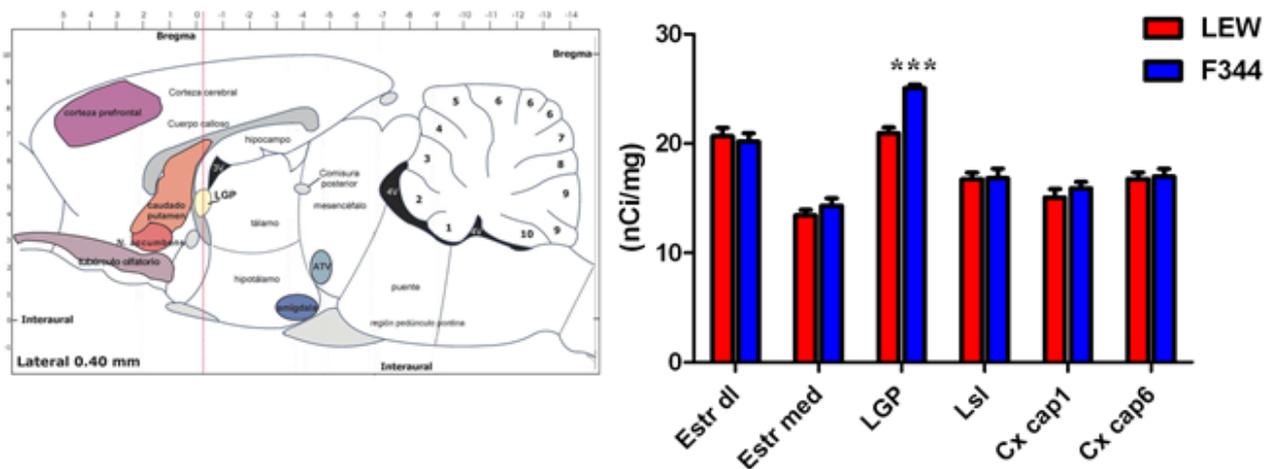
Región	Grupo		Significación estadística
	LEW	F344	
<b>Mesencéfalo (Bregma – 4,80)</b>			
Sustancia Negra	21,54 $\pm$ 1,28	22,60 $\pm$ 1,17	N.S. $t_{10}=0,61$ ; $p=0,553$
Nu. Talámico lateral	12,31 $\pm$ 0,73	10,27 $\pm$ 1,12	N.S. $t_{10}=1,53$ ; $p=0,158$
Sust. Gris Periacueductal	13,92 $\pm$ 0,92	12,07 $\pm$ 1,11	N.S. $t_{10}=1,29$ ; $p=0,227$
Área Tegmental Ventral	11,13 $\pm$ 0,72	9,32 $\pm$ 1,02	N.S. $t_{10}=1,45$ ; $p=0,179$
Corteza motora capa1	14,12 $\pm$ 0,72	12,96 $\pm$ 1,42	N.S. $t_{10}=0,73$ ; $p=0,483$
Corteza motora capa6	15,44 $\pm$ 0,62	14,03 $\pm$ 1,28	N.S. $t_{10}=0,99$ ; $p=0,344$
<b>Colículos (Bregma – 5,80)</b>			
Sustancia Negra	26,43 $\pm$ 0,31	25,46 $\pm$ 0,61	N.S. $t_{11}=1,35$ ; $p=0,204$
Colículos capa Zo	9,75 $\pm$ 0,55	7,97 $\pm$ 0,76	N.S. $t_{11}=1,82$ ; $p=0,095$
Sust. Gris Periacueductal	14,20 $\pm$ 0,84	11,73 $\pm$ 0,98	N.S. $t_{11}=1,87$ ; $p=0,088$
Área Tegmental Ventral	11,20 $\pm$ 0,83	9,21 $\pm$ 0,84	N.S. $t_{10}=1,64$ ; $p=0,133$
Corteza motora capa1	13,38 $\pm$ 0,69	12,21 $\pm$ 0,81	N.S. $t_{11}=1,08$ ; $p=0,301$
Corteza motora capa6	14,87 $\pm$ 0,47	13,67 $\pm$ 1,00	N.S. $t_{11}=1,03$ ; $p=0,327$
<b>Zona del Núcleo Dorsal del Rafe (Bregma – 7,80)</b>			
Núcleo Interpeduncular	7,16 $\pm$ 0,76	6,52 $\pm$ 0,61	N.S. $t_{11}=0,64$ ; $p=0,535$
Núcleo Dorsal del Rafe	9,06 $\pm$ 0,78	8,16 $\pm$ 0,80	N.S. $t_{11}=0,80$ ; $p=0,441$
Sust. Gris Periacueductal	11,37 $\pm$ 0,99	10,57 $\pm$ 1,13	N.S. $t_{11}=0,53$ ; $p=0,605$
<b>Cerebelo (Bregma – 10)</b>			
Núcleo Parabraquial	10,77 $\pm$ 0,84	11,18 $\pm$ 0,36	N.S. $t_{12}=0,44$ ; $p=0,668$
Sustancia Gris Central	9,38 $\pm$ 0,42	9,42 $\pm$ 0,60	N.S. $t_{12}=0,05$ ; $p=0,960$
Corteza Cerebelosa	21,44 $\pm$ 0,43	20,60 $\pm$ 0,40	N.S. $t_{12}=1,44$ ; $p=0,177$

Los análisis estadísticos realizados mostraron que de las 38 regiones cerebrales analizadas, las ratas LEW y F344 sólo difieren, a nivel basal, en la densidad de receptores de cannabinoides en el núcleo lateral del globo pálido. Las ratas de la cepa F344 muestran una mayor concentración de receptores cannabinoides en este núcleo que las ratas de la cepa LEW, siendo esta diferencia altamente significativa ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,886$ ).

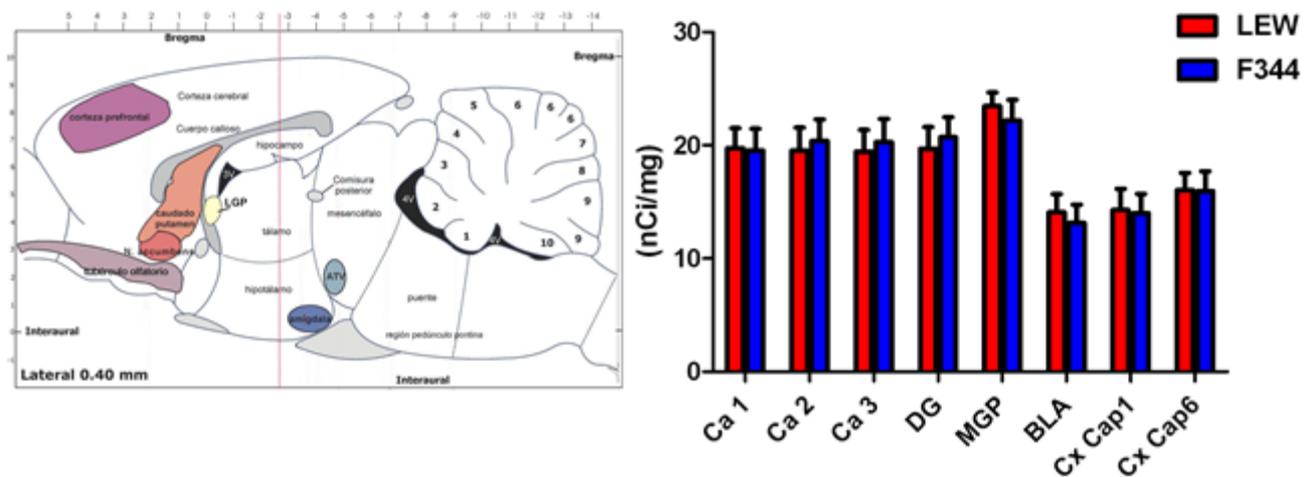
En las figuras que mostramos a continuación, se representan las diferentes densidades de receptores de cannabinoides observadas en las distintas regiones estudiadas (Figuras 10 - 16). Las figuras están ilustradas con cortes sagitales de cerebro de rata, en los que se muestran los distintos niveles en que fueron recogidos los cortes coronales de 20  $\mu\text{m}$  de grosor.



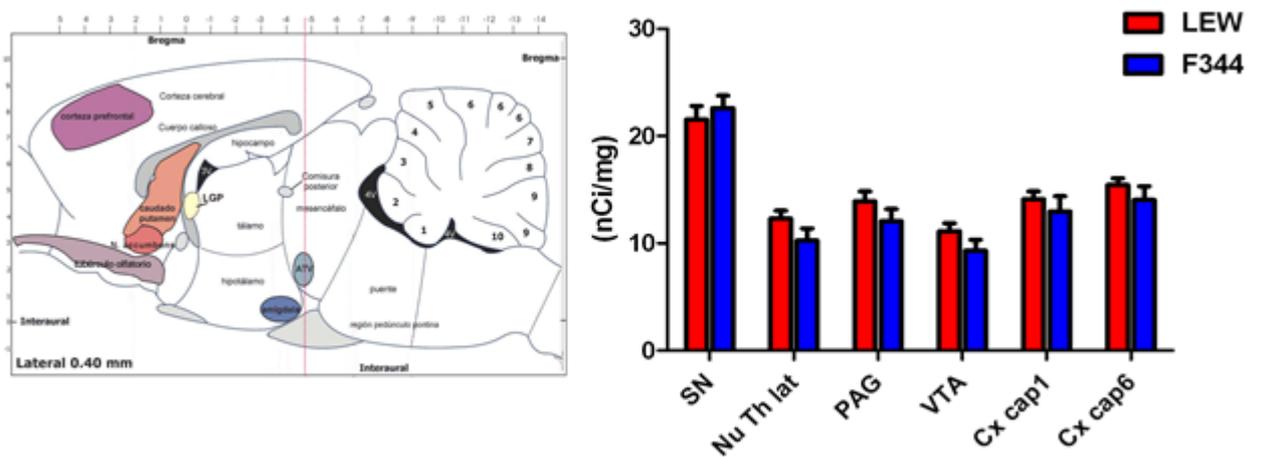
**Figura 10. Unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Cerebro anterior).** Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m de la unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: estriado dorsolateral (Estr dl), estriado medial (Estr med), NAcc Shell lateral (Shell lat), NAcc Shell medial (Shell med), capa 1 de la corteza motora (Cx cap1), capa 6 de la corteza motora (Cx cap6).



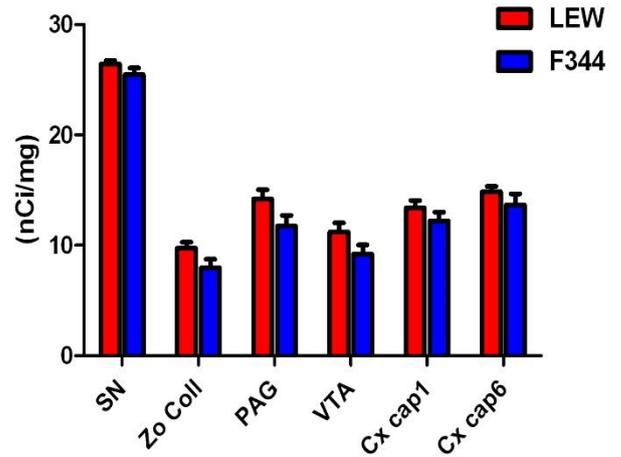
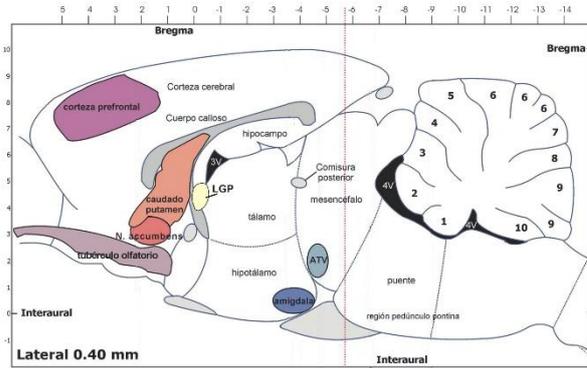
**Figura 11. Unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Núcleos Septales).** Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m de la unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: estriado dorsolateral (Estr dl), estriado medial (Estr med), núcleo lateral del globo pálido (LGP), núcleo septal lateral intermedio (Lsl), capa 1 de la corteza motora (Cx cap1), capa 6 de la corteza motora (Cx cap6).



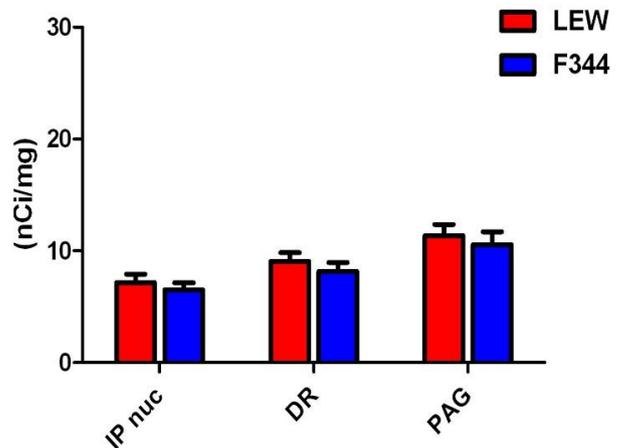
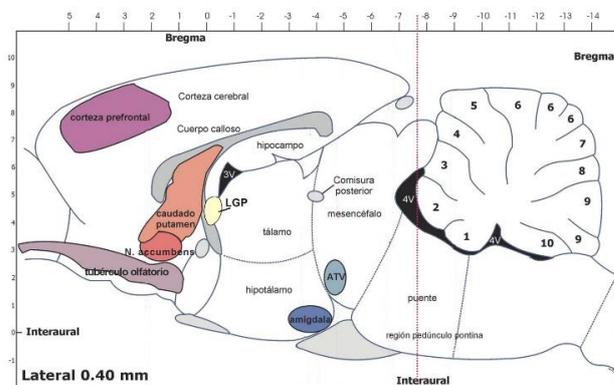
**Figura 12. Unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Hipocampo).** Los valores representan la media ± e.e.m de la unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: Campo1 del Hipocampo (Ca 1), Campo2 del Hipocampo (Ca 2), Campo3 del Hipocampo (Ca 3), Giro Dentado (DG), núcleo medial del globo pálido (MGP), núcleo basolateral de la amígdala (BLA), capa 1 de la corteza motora (Cx cap1), capa 6 de la corteza motora (Cx cap6).



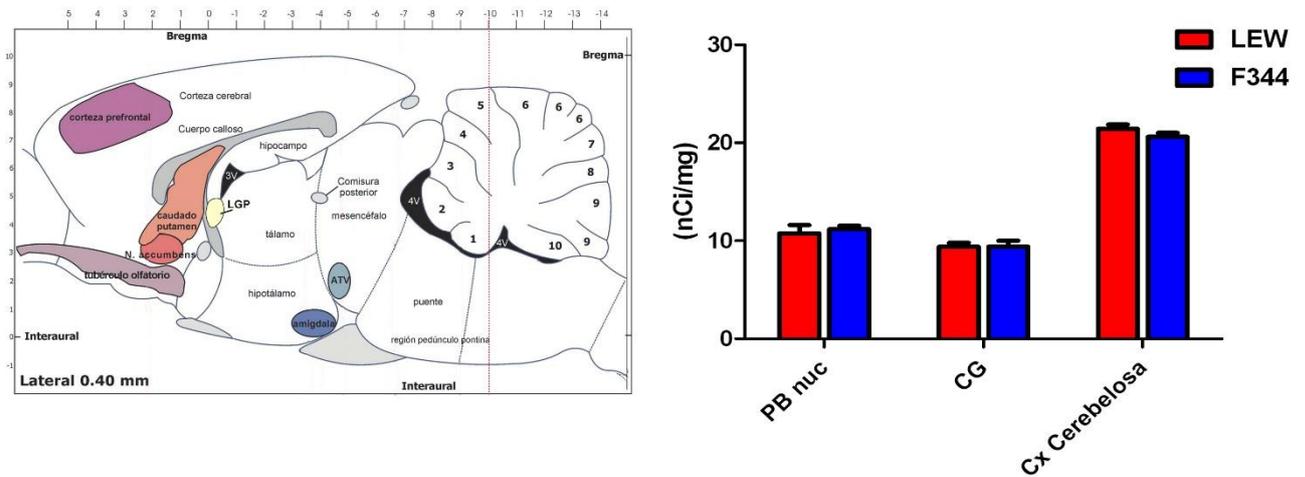
**Figura 13. Unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Mesencéfalo).** Los valores representan la media ± e.e.m de la unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: Sustancia Negra (SN), núcleo lateral del tálamo (Nu Th lat), Sustancia Gris Periacueductal (PAG), Área Tegmental Ventral (ATV), capa 1 de la corteza motora (Cx cap1), capa 6 de la corteza motora (Cx cap6).



**Figura 14. Unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  a los receptores de cannabinoides (Colículos).** Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m de la unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: Sustancia Negra (SN), capa Zo de los colículos (Zo Coll), Sustancia Gris Periacueductal (PAG), Área Tegmental Ventral (ATV), capa 1 de la corteza motora (Cx cap1), capa 6 de la corteza motora (Cx cap6).

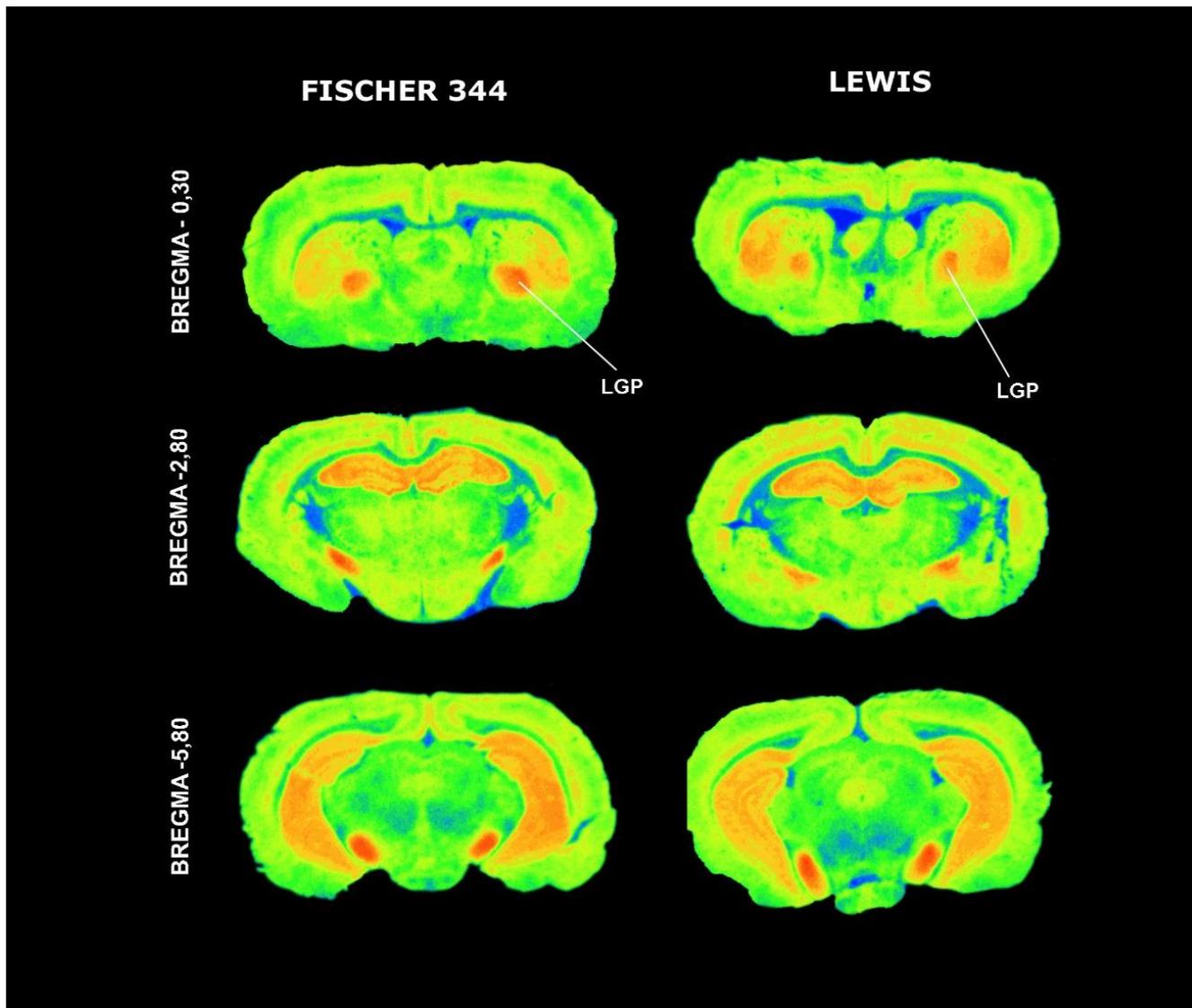


**Figura 15. Unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  a los receptores de cannabinoides (Zona del Núcleo Dorsal del Rafe).** Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m de la unión específica de  $^3\text{H-CP 55,940}$  (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: núcleo interpeduncular (IP nuc), núcleo dorsal del rafe (DR), Sustancia Gris Periacueductal (PAG).



**Figura 16. Unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 a los receptores de cannabinoides (Cerebelo).** Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m de la unión específica de <sup>3</sup>H-CP 55,940 (nCi/mg de tejido) a los receptores de cannabinoides en las dos cepas de ratas estudiadas. Regiones: núcleo parabraquial (PB nuc), Sustancia Gris Central (CG), corteza cerebelosa (Cx Cerebelosa).

Para finalizar la exposición de los resultados obtenidos en nuestro estudio de autorradiografía cuantitativa de receptores cannabinoides, en la Figura 17 presentamos imágenes representativas tomadas a diferentes niveles de corte. En ellas se señala el núcleo lateral del globo pálido, único núcleo en el que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la concentración de receptores de cannabinoides entre las cepas de ratas LEW y F344.



**Figura 17. Imágenes autorradiográficas representativas.** Se muestran imágenes a tres niveles de corte: Núcleos Septales (Bregma -0,30), Hipocampo (Bregma -2,80) y Colículos (Brema -5,80). En la imagen, se puede observar la diferencia en densidad de receptores de cannabinoides en el núcleo lateral del globo pálido (LGP) entre las ratas LEW y F344. Las imágenes originales fueron convertidas a un código de pseudocolor utilizando el programa Scion Image program (Scion Corporation. Frederick. MA. USA).

## 5.2. Resultados: qRT-PCR. Expresión génica basal de enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides y de sus principales receptores.

Teniendo en cuenta que en la literatura científica se describe la diferente sensibilidad a los efectos del THC, principal agente psicoactivo de la marihuana, que muestran las cepas de rata Lewis y Fischer 344 (Lepore et al., 1996), nos sorprendió no encontrar más diferencias en la distribución de receptores cannabinoides en nuestro estudio de autorradiografía cuantitativa. De esta manera, decidimos ampliar la búsqueda de diferencias basales en el sistema endocannabinoide de estas dos cepas de rata, investigando la expresión de los genes que codifican las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides, del receptor CB1 y del receptor de lisofosfatidil inositol GPR55, al que sabemos que también se unen los endocannabinoides, en dos áreas cerebrales estrechamente relacionadas con conductas adictivas: el PFC y el NAcc.

Al analizar por PCR en tiempo real los niveles de ARN mensajero de las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides encontramos diferencias en los ARNm que codifican enzimas de degradación, pero no en los que codifican las enzimas de síntesis, y estas diferencias siempre mostraron un nivel menor de expresión en las ratas de la cepa Fischer 344.

Así, no encontramos diferencias en la expresión génica de NAPE-PLD, la enzima fundamental en la síntesis de AEA, ni en PFC, ni en NAcc, y sí encontramos una menor expresión génica de FAAH, la principal enzima responsable de su degradación, en las ratas de la raza Fischer 344 en las dos áreas cerebrales estudiadas (CPF:  $t_{17} = 4.432$ ,  $p < 0.001$ ,  $r = 0.73$ ; NAcc:  $t_{12} = 2.499$ ,  $p < 0.05$ ,  $r = 0.58$ ) (Figura 18).

Encontramos un patrón similar al estudiar las enzimas relacionadas con el otro endocannabinoide: el 2-AG. La expresión génica de DAGL, su principal enzima de síntesis, fue similar en ambas razas de rata en las dos áreas estudiadas, mientras que la expresión génica de MAGL, su principal enzima de degradación, fue menor en las ratas de la cepa Fischer 344 en el PFC ( $t_{17} = 5.849$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r = 0.82$ ) y sin diferencias apreciables en el NAcc (Figura 18).

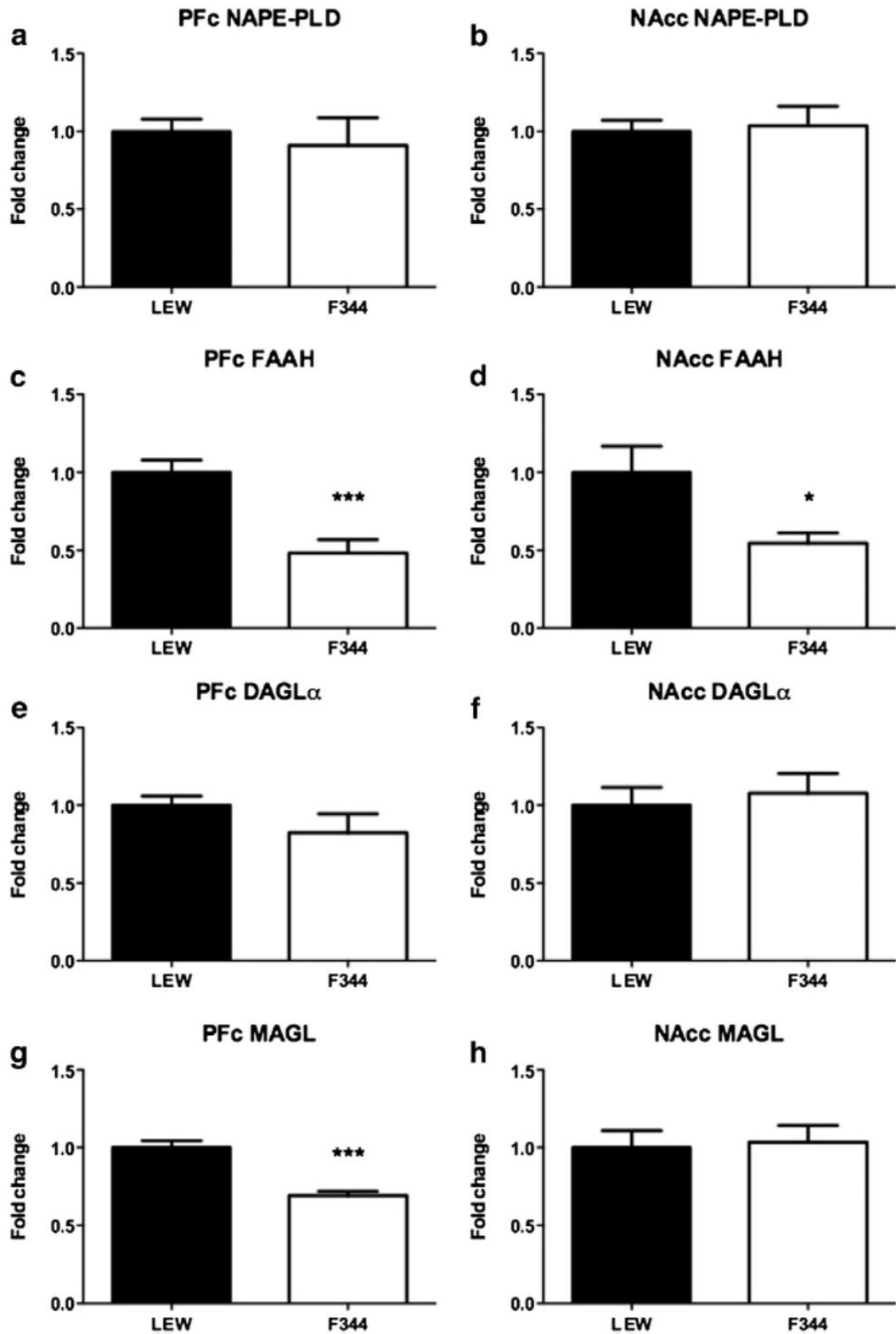
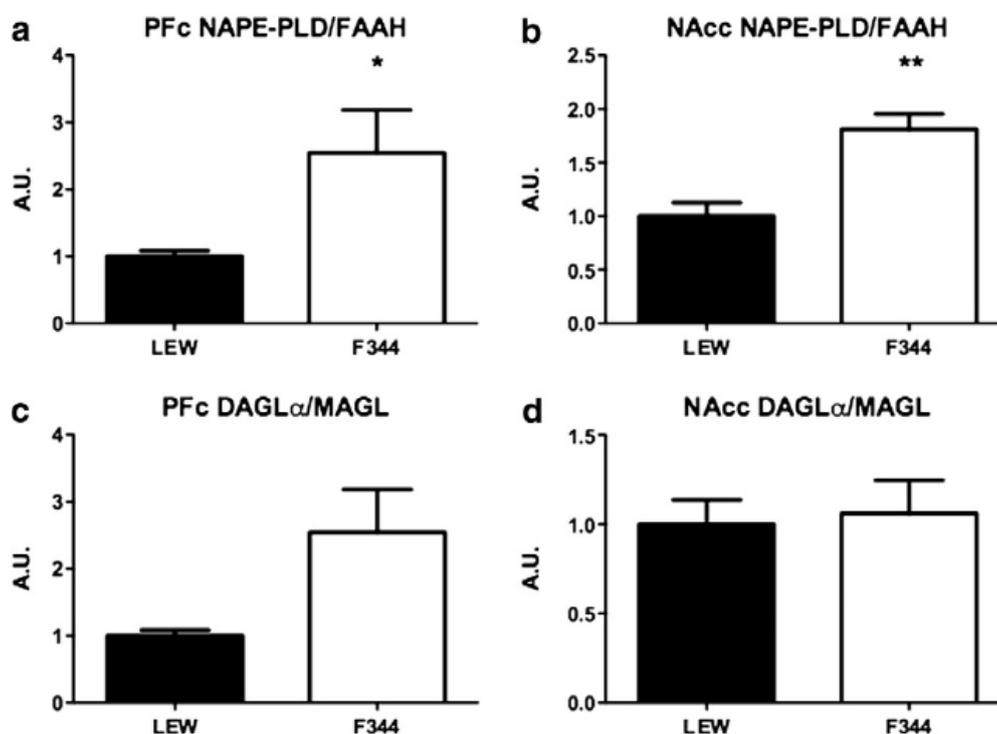


Figura 18. Expresión de los genes que codifican las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides. NAPE-PLD y FAAH, síntesis y degradación de AEA respectivamente; DAGL y MAGL, síntesis y degradación de 2-AG respectivamente. \*\*\*  $p < 0.001$  respecto a las ratas Lewis.

Con el fin de obtener un índice indirecto de los niveles de endocannabinoides, calculamos la razón entre los niveles de ARNm de las enzimas de síntesis y las de degradación.

Como era de esperar, el índice indirecto de AEA así obtenido, la razón NAPE-PLD/FAAH, estaba significativamente aumentado en las ratas de la cepa Fischer 344 respecto a las de la cepa Lewis en las dos áreas cerebrales estudiadas (CPF:  $t_{17} = 2.390$ ,  $p < 0.05$ ,  $r = 0.50$ ; NAcc:  $t_{11} = 4.282$ ,  $p < 0.01$ ,  $r = 0.79$ ). Sin embargo, al estudiar el índice de 2-AG, la razón DAGL/MAGL, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ni en PFC ni en NAcc (Figura 19).



**Figura 19. Relación entre la expresión de las enzimas de síntesis respecto a las de degradación de los principales endocannabinoides en el PFC y el NAcc en ratas Lewis y Fischer 344.** Síntesis/Degradación de AEA (NAPE-PLD/FAAH) y Síntesis/Degradación de 2-AG (DAGL/MAGL). Los datos son expresados en unidades arbitrarias. \*  $p < 0.05$  respecto a las ratas Lewis.

A pesar de no haber encontrado diferencias en densidad de receptores cannabinoides en estas áreas a través de la autorradiografía cuantitativa, decidimos comprobar si podíamos encontrarlas en la expresión de los genes que codifican su

principal receptor, el CB1, y el receptor de lisofosfatidil inositol, GPR55, calificado en muchas ocasiones como candidato a ser el tercer receptor de cannabinoides.

Los datos extraídos de la PCR en tiempo real, muestran una expresión más débil del gen que codifica el receptor CB1 en el PFC de las ratas de la cepa Fischer 344 ( $t_{16} = 3.156$ ,  $p < 0.01$ ,  $r = 0.62$ ), mientras que en el NAcc no apreciamos diferencias estadísticamente significativas. Con respecto al otro receptor estudiado, no encontramos diferencias en ninguna de las dos áreas analizadas (Figura 20).

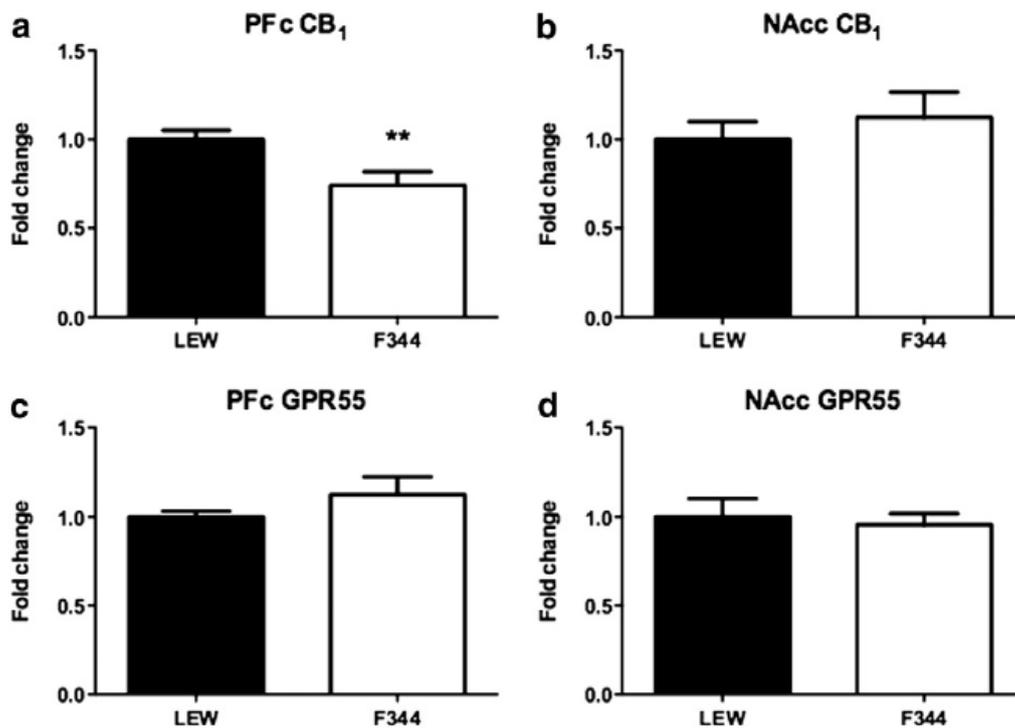
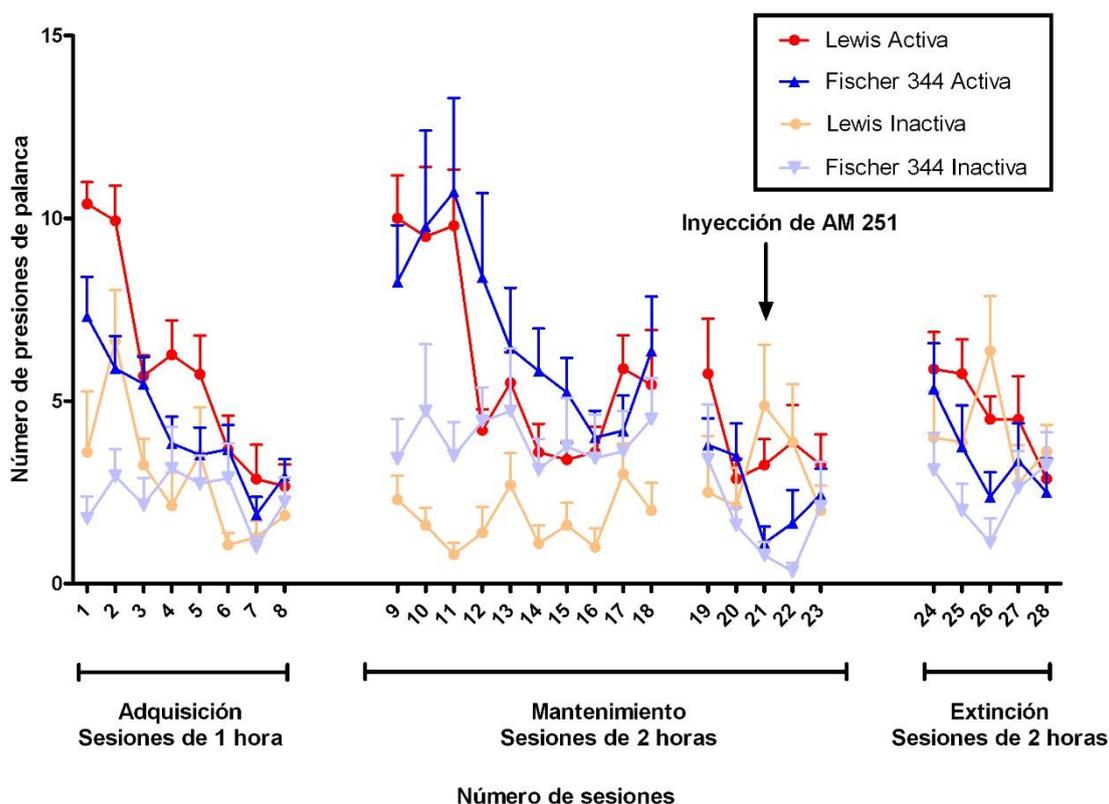


Figura 20. Expresión de los genes que codifican los receptores CB1 y GPR55 en PFC y NAcc de ratas Lewis y Fischer 344. \*\*  $p < 0.01$ .

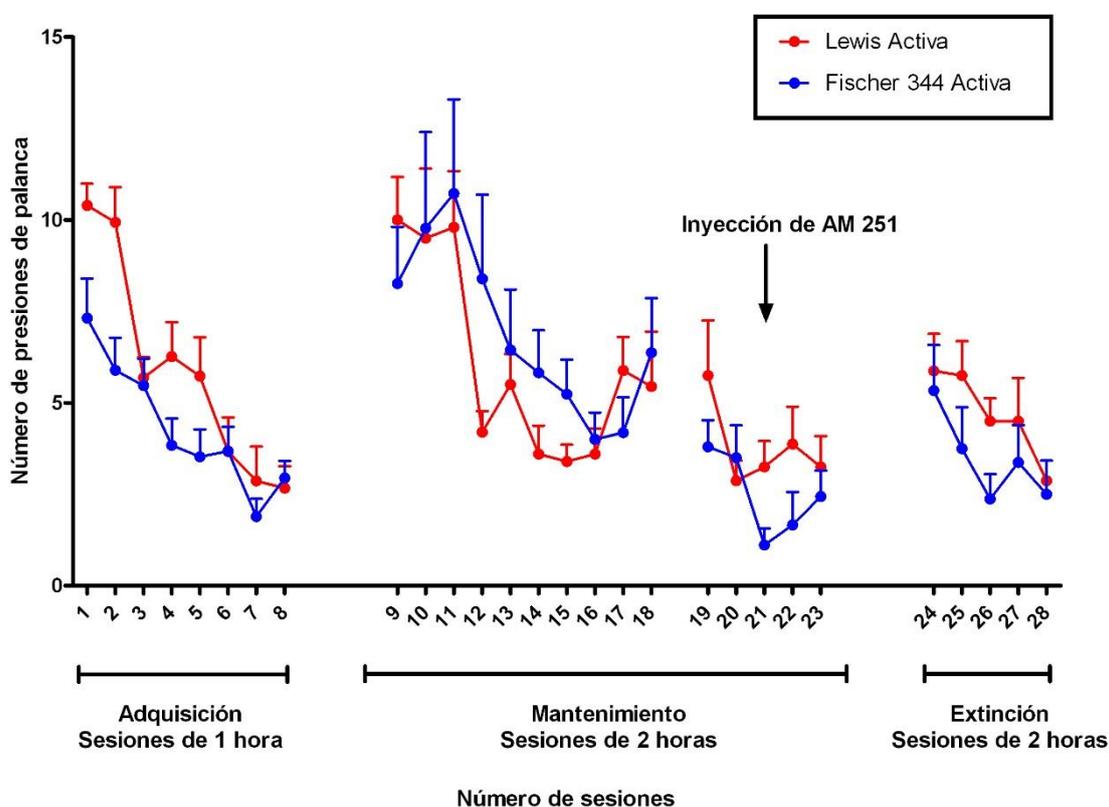
### 5.3. Resultados: autoadministración intravenosa del agonista sintético de receptores cannabinoides WIN 55,212-2

Una vez obtenidos los datos sobre el sistema endocannabinoide a nivel basal de las ratas Lewis y Fischer 344, decidimos intentar que animales de estas cepas de rata se autoadministrasen un cannabinoide por vía intravenosa. En experimentos anteriores en nuestro laboratorio, los animales de estas razas se habían mostrado como un modelo consistente de vulnerabilidad/resistencia (Lewis/Fischer 344) a la autoadministración de sustancias con potencial adictivo, sobre todo a cocaína y morfina. Sabíamos que era muy difícil conseguir que ratas se autoadministrasen cannabinoides por vía intravenosa, por ello decidimos intentarlo con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2, ya que de los pocos artículos científicos en los que describían que conseguían una autoadministración estable, la mayoría utilizaban este aminoalquilindol.



**Figura 21. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Lewis y Fischer 344.** En la figura se muestran el número de presiones de las palancas activa e inactiva. Los animales recibían una dosis de 12,5 µg/kg de WIN 55,212-2 cuando presionaban la palanca activa.

Los resultados conductuales obtenidos durante el estudio de autoadministración del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 se muestran en la Figura 21. En ella están representadas las fases de adquisición, mantenimiento y extinción. Ratas de las cepas LEW y F344 recibieron una inyección de WIN 55,212-2 (12,5 µg/kg) en el momento en que el animal presionaba la palanca izquierda (activa) de la caja de condicionamiento. La presión de la palanca derecha (inactiva) fue registrada aunque su presión no tenía programada ninguna consecuencia. El número de inyecciones autoadministradas disminuyó rápidamente en las distintas fases, sin conseguir mantener una estabilidad intersesiones en el número de presiones de la palanca activa, demostrando que las ratas de las cepas LEW y F344 no adquieren una conducta estable de autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2.



**Figura 22. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Lewis y Fischer 344.** En la figura se muestra el número de presiones de palanca activa. Los animales recibían una dosis de 12,5 µg/kg de WIN 55,212-2 cuando presionaban la palanca activa.

Comparando las presiones de palanca activa entre las dos cepas (Figura 14), y analizando los datos por fases, observamos que durante la fase de adquisición, las ratas presionaron más la palanca activa en las dos primeras sesiones de

autoadministración ( $10,5 \pm 1,04$  y  $9,9 \pm 1,06$  presiones de media para las LEW y  $7,3 \pm 0,90$  y  $5,9 \pm 0,91$  para las F344), reduciendo el número de presiones en las siguientes sesiones hasta alcanzar un nivel muy bajo en las dos últimas sesiones de esta fase ( $2,9 \pm 0,77$  y  $2,7 \pm 0,59$  presiones de palanca activa de media en las sesiones 7 y 8, respectivamente, para las LEW, y  $1,9 \pm 0,66$  y  $2,9 \pm 0,50$  presiones de media para las F344). El análisis estadístico muestra que existe un efecto significativo en la interacción SESIÓN x RAZA ( $F_{7,217} = 2,631$ ;  $p < 0,05$ ) y un efecto global del factor RAZA también significativo ( $F_{1,31} = 4,511$ ;  $p < 0,05$ ). Encontramos diferencias significativas entre las razas en la sesión 1 ( $t_{32} = 2,32$ ;  $p < 0,05$ ), en la sesión 2 ( $t_{33} = 3,09$ ;  $p < 0,05$ ) y en la sesión 4 ( $t_{32} = 2,07$ ;  $p < 0,05$ ). Debemos tener en cuenta que, durante las sesiones de autoadministración, las ratas fueron sometidas a restricción alimentaria, y en las dos primeras sesiones se colocaron dos pellets sobre la palanca activa, lo que dificulta considerar que las presiones de esta palanca durante las sesiones 1 y 2 de adquisición se deban a los efectos reforzantes de la droga. Por tanto, no podemos asegurar que existan diferencias, en función de la raza, en la adquisición de la conducta de autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2.

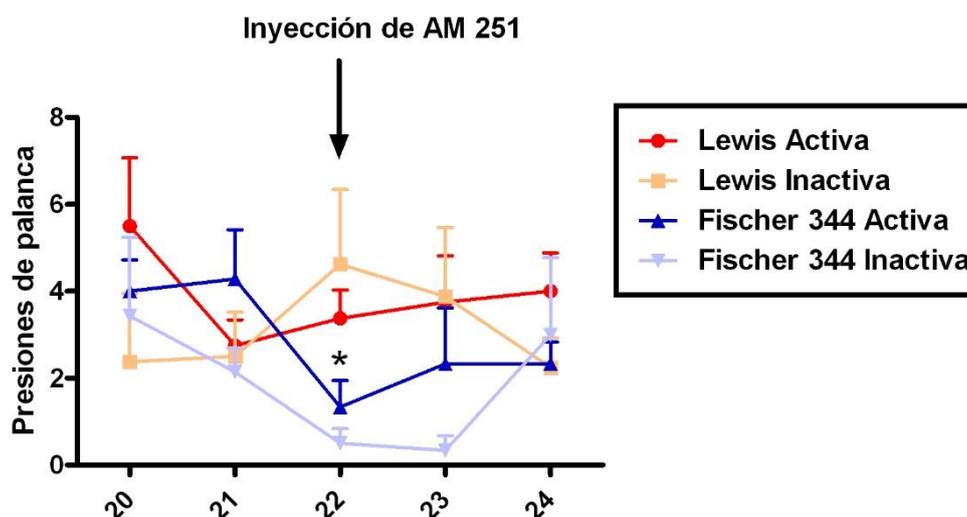
En la fase de mantenimiento, podemos distinguir 2 etapas:

- De la sesión 9 a la 18: En la primera sesión de la fase de mantenimiento (sesión 9), se aumenta el tiempo de los animales en las cajas de autoadministración a 2 horas y se mantiene sin ningún cambio hasta la sesión 18, 10ª de la fase de mantenimiento.
- De la sesión 19 a la 23: En las sesiones 19 y 20 se administró a los animales, a través de una inyección intraperitoneal, 1 ml/kg de vehículo del antagonista de los receptores CB1 AM251, media hora antes del comienzo de cada sesión. En la sesión 21 se administró, del mismo modo, 4 mg/ml/kg de AM251. Las sesiones 22 y 23 siguen exactamente las pautas de las sesiones de mantenimiento de la etapa anterior (sesiones 9-18).

Durante la primera etapa de la fase de mantenimiento, los resultados muestran un patrón muy similar al desarrollado durante la fase de adquisición, es en las primeras sesiones donde se producen más presiones de la palanca activa ( $10 \pm 1,93$ ;  $9,5 \pm 3,34$  y  $9,8 \pm 3,12$  presiones de media de la raza LEW, y  $8,3 \pm 1,45$ ;  $9,8 \pm 2,50$  y  $10,7 \pm 2,34$  presiones de media para las ratas F344, en las sesiones 9, 10 y 11 respectivamente), reduciéndose progresivamente conforme avanzan las sesiones, hasta alcanzar su punto más bajo,  $3,4 \pm 1,08$  presiones de media para las ratas LEW en la sesión 15, y  $4 \pm 0,67$  presiones de media para las ratas F344 en la sesión 16. En

las últimas sesiones de esta etapa se produce un ligero repunte, siendo la media de presiones de palanca activa en la sesión 18, de  $5,4 \pm 1,83$  para LEW y de  $6,4 \pm 1,37$  para F344.

Para explicar la elevación en el número de presiones de la palanca activa que se produce entre la última sesión de la fase de adquisición y la primera de la fase de mantenimiento, debemos tener en cuenta los cambios que se producen en la situación experimental: se duplica el tiempo de estancia de los animales en las cajas de autoadministración, pasando de 1 hora a 2 horas. El aumento de presiones sobre la palanca activa puede deberse, en gran medida, al cambio de la situación experimental, resultando difícil establecer una relación directa entre esta conducta y el valor reforzante de la droga. En el análisis estadístico de la fase de mantenimiento no encontramos ningún efecto significativo, ni en la interacción SESIÓN x RAZA ( $F_{9,207} = 1,041$ ; n.s.), ni en el efecto global de la RAZA ( $F_{1,23} = 1,041$ ; n.s.).



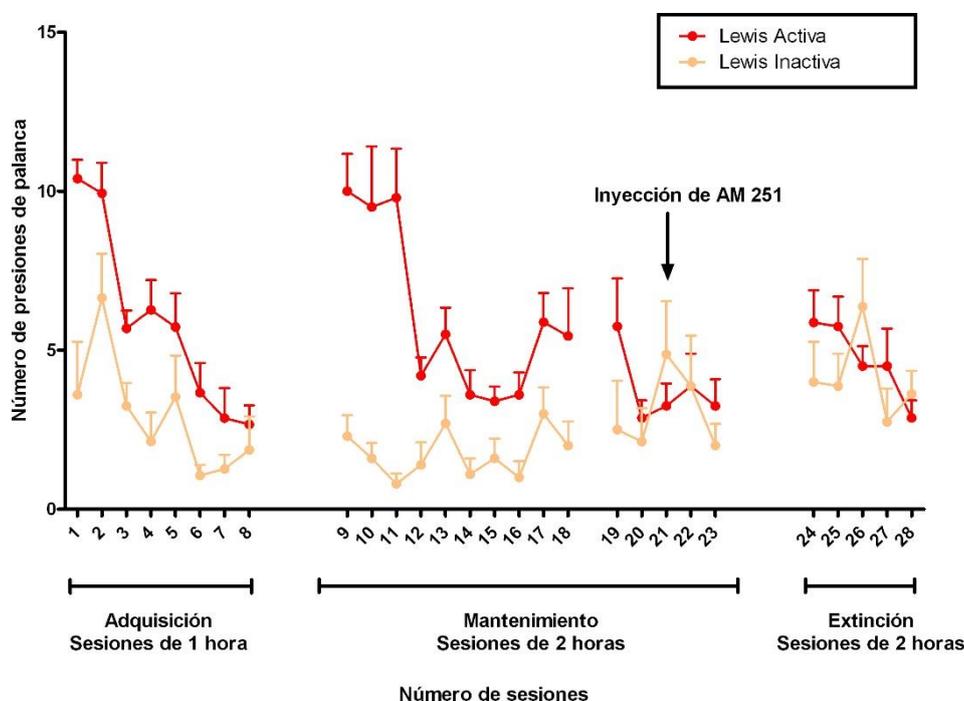
**Figura 23. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 durante las 5 últimas sesiones de la fase de mantenimiento en ratas Lewis y Fischer 344.** En la figura se muestra el número de presiones de palanca activa e inactiva. Se señala con una flecha la sesión en la que se administra el antagonista cannabinoide AM251.

En la segunda etapa de la fase de mantenimiento (sesiones 19 – 23), analizamos las diferencias en la conducta de presión de palanca entre las sesiones 20 y 21 para comprobar si la inyección del antagonista de los receptores CB1, AM251, tiene algún efecto sobre ésta. Las ratas F344 mostraron una disminución estadísticamente significativa en el número de presiones sobre la palanca activa ( $t_8 = 2,46$ ;  $p < 0,05$ ), mientras las LEW no encontramos ningún efecto ( $t_7 = 0,497$ ; n.s.). No se

observaron cambios estadísticamente significativos en ninguna de las dos cepas en el número de presiones sobre la palanca inactiva ( $F_{344} t_8 = 1$ ; n.s. / LEW  $t_7 = 2,02$ ; n.s.).

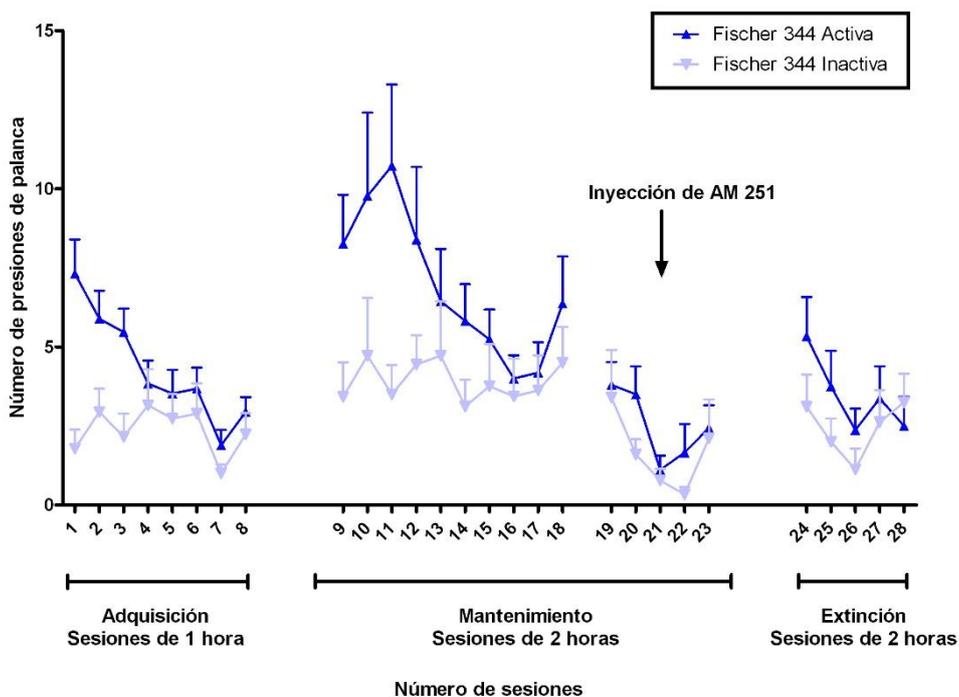
En la Figura 23, se puede observar como las ratas de la cepa F344 reducen el número de presiones sobre la palanca activa en respuesta al antagonista cannabinoide, mientras que las de la cepa LEW no varían su conducta.

En cuanto a los datos obtenidos en las sesiones de extinción, el análisis estadístico muestra que no se observa efecto significativo alguno, ni estudiando la interacción SESIÓN x RAZA ( $F_{4,56} = 0,657$ ; n.s.), ni estudiando el efecto global de la RAZA ( $F_{1,14} = 1,43$ ; n.s.). En la Figura 22 podemos observar un aumento de presiones sobre la palanca activa el primer día de extinción. Así, las LEW pasan de una media de presiones de  $3,25 \pm 0,79$  en el último día de la fase de mantenimiento, a  $5,86 \pm 1,21$  en el primer día de extinción, y las F344, de  $2,44 \pm 0,75$  a  $5,33 \pm 1,21$ . Esta diferencia, aunque no es significativa, muestra que existe una tendencia en ambas cepas (LEW  $t_7 = 2,027$ ;  $p = 0,08$  / F344  $t_8 = 2,095$ ;  $p = 0,07$ ) a presionar más al no recibir el reforzador, lo que puede ser indicio de que existe, en alguna medida, una conducta de búsqueda de droga, aunque en nuestro estudio no teníamos establecida una conducta de autoadministración lo suficientemente estable como para poder valorar su extinción.



**Figura 24. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Lewis.** En la figura se muestra el número de presiones de palanca activa e inactiva. Los animales recibían una dosis de  $12,5 \mu\text{g/kg}$  de WIN 55,212-2 cuando presionaban la palanca activa.

En las Figuras 24 y 25, mostramos el número de presiones de palanca, tanto activa como inactiva, a lo largo de las sesiones en cada una de las razas. Podemos observar que existe un paralelismo en la conducta exhibida por ambas cepas de ratas. Ambas gráficas muestran patrones que comienzan con un elevado número de presiones sobre la palanca activa al comienzo de cada fase del experimento (adquisición, mantenimiento y extinción), que se reducen progresivamente a lo largo de las siguientes sesiones de cada fase. Tal y como se deduce del análisis de los resultados, las cepas de ratas LEW y F344 no adquieren una conducta estable de autoadministración intravenosa de WIN 55, 212-2, no habiendo diferencias entre ambas cepas. Por otro lado, las ratas de la cepa F344 reducen significativamente las presiones sobre la palanca activa en respuesta al antagonista cannabinoide AM251, y ambas cepas, LEW y F344, incrementan el número de presiones sobre esta palanca en la primera sesión de extinción.



**Figura 25. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2 y su extinción en ratas Fischer 344.** En la figura se muestra el número de presiones de palanca activa e inactiva. Los animales recibían una dosis de 12,5 µg/kg de WIN 55,212-2 cuando presionaban la palanca activa.

En cuanto a las diferencias en el número de presiones sobre la palanca activa e inactiva (Figura 26), los análisis estadísticos revelaron que tanto en la fase de adquisición como en la de mantenimiento, ambas cepas presionaron más la palanca activa que la inactiva.

En la fase de adquisición, la diferencia en el promedio de presiones de palanca, entre la palanca activa y la inactiva, es estadísticamente significativa en las LEW ( $t_9=3,04$ ;  $p < 0,05$ ) y altamente significativa en las F344 ( $t_{16}=3,24$ ;  $p < 0,001$ ). En la fase de mantenimiento, esta diferencia es estadísticamente significativa en las F344 ( $t_{16}=2,54$ ;  $p < 0,05$ ) y altamente significativa en las LEW ( $t_9=7,59$ ;  $p < 0,001$ ). Estas diferencias, siendo siempre mayor el número de presiones de palanca activa que de inactiva, indica que puede existir en ambas cepas, LEW y F344, una cierta especificidad en la conducta de búsqueda de la droga.

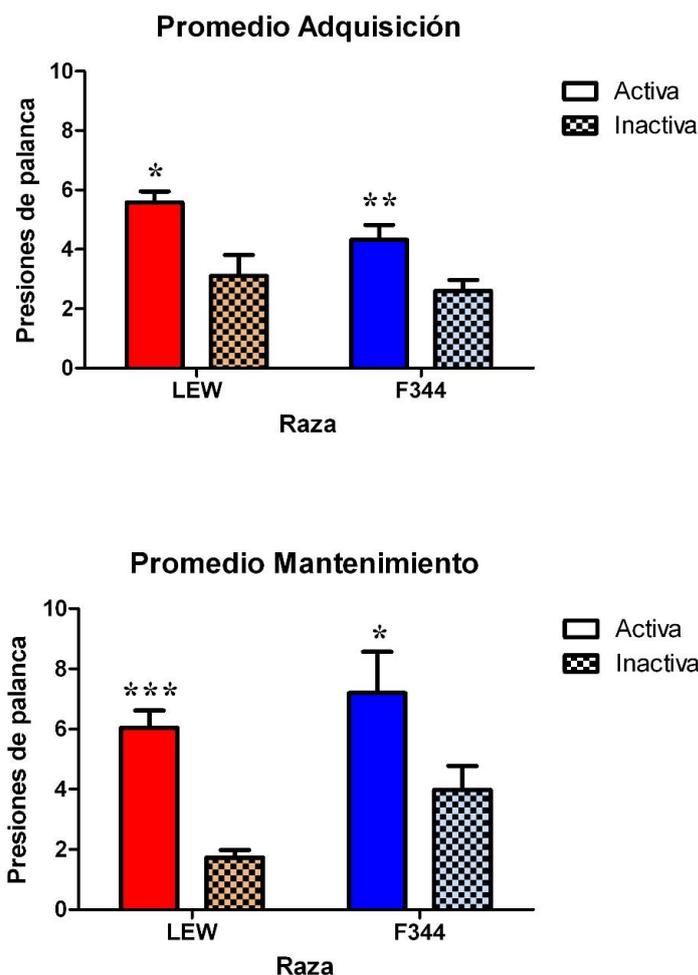


Figura 26. Promedio de presiones de palanca activa e inactiva en las fases de adquisición y mantenimiento, en ratas LEW y F344.

#### 5.4. Resultados: autoadministración intravenosa de morfina y extinción de dicha conducta

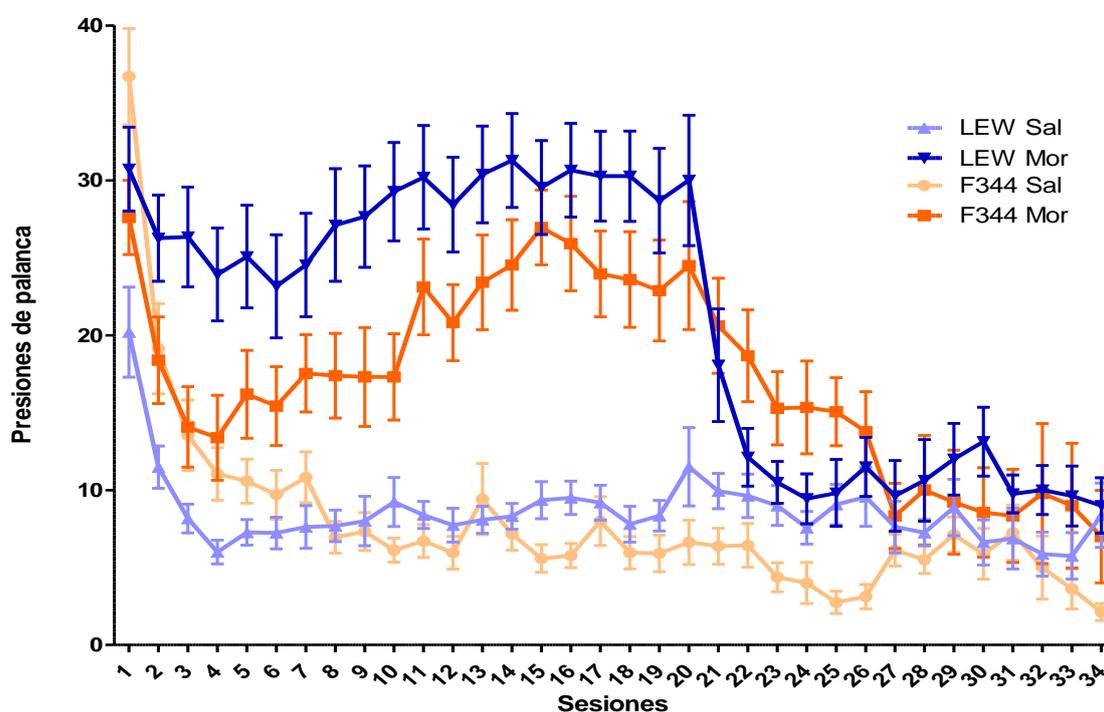
Al no conseguir una administración estable del agonista cannabinoide, pero contar con valiosos datos basales de distintos parámetros del sistema endocannabinoide de ratas Lewis y Fischer 344, decidimos continuar la investigación por una vía paralela. Conociendo la interconexión que describe la literatura científica entre los sistemas opioide y cannabinoide endógenos y los distintos patrones de autoadministración de morfina de estas razas de rata, decidimos explorar los efectos que la autoadministración de morfina y la extinción de esta conducta podría tener sobre el sistema endocannabinoide.

Diseñamos un programa de condicionamiento operante de razón fija 1, que constaría de 19 sesiones de autoadministración de morfina (1 mg/kg) y 15 sesiones de extinción en las se sustituyó la droga por suero salino. Como describimos en materiales y métodos, las sesiones tuvieron una duración de 12 horas cada una y se realizaron en el periodo de mayor actividad de los animales, de 20 a 8 horas.

Para poder realizar las pruebas bioquímicas sobre distintos parámetros del sistema endocannabinoide, sacrificamos a los animales para obtener muestras de tejido cerebral y bazo, en tres momentos distintos del programa: tras los 19 días de autoadministración de morfina, tras 7 días de extinción y tras los 15 días de extinción. Teniendo en cuenta que contamos con ratas de dos cepas distintas, que necesitaríamos controles salinos en todos los casos y que solo podíamos disponer de 12 cajas de condicionamiento operante, tuvimos que realizar 10 tandas (un total de 117 ratas) para conseguir que 102 animales terminasen con éxito todo el proceso.

En la figura 27 mostramos la gráfica de la conducta operante. Por resultados como los mostrados en esta gráfica es por lo que se considera a estas dos cepas de rata como un buen modelo de vulnerabilidad/resistencia (Lewis/Fischer 344) al abuso de opiáceos, dentro del paradigma de la autoadministración intravenosa. En la literatura se describe como las ratas de la cepa Lewis adquieren antes una conducta estable de autoadministración de morfina y se autoadministran más que las ratas de la cepa Fischer 344. En nuestro caso, observamos un descenso en el número de presiones de palanca en las primeras 4 sesiones en todos los grupos, siendo mucho menos acusado en los animales Lewis que obtenían una inyección de morfina con cada presión de palanca. Esto era lo esperado, teniendo en cuenta que los animales fueron entrenados previamente a presionar la palanca (habiendo sido sometidos a una

cierta restricción alimenticia) utilizando pellets de comida como reforzador, y que en la primera sesión con morfina también estaban con dieta restringida. La menor caída en el número de presiones de palanca de las Lewis morfina y la diferencia a su favor con respecto a su control salino (mínima diferencia en la sesión uno,  $30,7 \pm 13,4 / 20,6 \pm 14,7$  ((media  $\pm$  desviación estándar)), máxima diferencia en la sesión cuatro,  $24 \pm 15,5 / 6,1 \pm 4,1$ ) reflejan la facilidad que muestran los opiáceos para funcionar como reforzadores en las ratas de esta raza. Las ratas Fischer-morfina, tal y como se suponía por su condición de “resistentes”, no se diferencian claramente de sus controles salinos hasta la quinta sesión ( $14,8 \pm 13,5 / 9 \pm 5,8$ ).



**Figura 27. Conducta de autoadministración de morfina y su extinción en ratas Lewis y Fischer 344.** En la figura se muestra el número de presiones de palanca activa. Los animales recibían una dosis de 1 mg/kg de morfina, o un volumen equivalente de suero salino, cuando presionaban la palanca activa.

Durante el resto de las sesiones de autoadministración de morfina, la media de presiones de palanca en ambas cepas de rata asciende progresivamente hasta mantener un número elevado, alejado siempre de sus controles salinos, y relativamente estable a lo largo de las últimas 10 sesiones de esta fase (Lewis: media menor en la sesión 12 con  $28,3 \pm 15,1$  y más alta en la sesión 14 con  $31,6 \pm 15,4$ ; Fischer 344: media menor en la sesión 10 con  $18,3 \pm 14,7$  y mayor en la sesión 15 con

25,7 ± 11,7). Confirmando lo descrito en la literatura, las ratas de la cepa Lewis presionan siempre más que las Fischer 344 (la sesión con una media de presión más baja de las Lewis es la sexta ((23,4 ± 16,8)), tasa de respuesta operante que las Fischer 344 no superan hasta la sesión 15) y mantienen mayor regularidad entre sesiones.

El ANOVA de medidas repetidas de las 19 sesiones de autoadministración muestra un efecto global del factor RAZA ( $F_{1,75} = 4,065$ ;  $p < 0,05$ ) y de la interacción RAZA x TRATAMIENTO ( $F_{1,75} = 4,104$ ;  $p < 0,05$ ) confirmando la diferencia conductual de ambas cepas de rata ante la morfina. Analizando los efectos intrasujetos encontramos significativas las interacciones SESIÓN x RAZA ( $F_{18,1350} = 2,596$ ;  $p < 0,01$ ) y SESIÓN x TRATAMIENTO ( $F_{18,1350} = 8,932$ ;  $p < 0,001$ ), y la doble interacción SESIÓN x RAZA x TRATAMIENTO ( $F_{18,1350} = 2,579$ ;  $p < 0,01$ ) que corroboran la distinta evolución a lo largo de las sesiones que se observa en función de la cepa a la que pertenece la rata y si toma morfina o salino. Es importante destacar que no se observan efectos significativos en función del grupo de extinción al que pertenezcan los animales. Recordamos que para los análisis bioquímicos se sacrificaron a los animales a tres tiempos de extinción (0, 7 y 15), pero que las 19 sesiones de autoadministración las realizaron todos los animales, por lo que era necesario confirmar que no existía ningún sesgo a la hora de seleccionar las ratas que sacrificaríamos al terminar la autoadministración (extinción 0) respecto a las que continuarían con el programa de extinción (grupos extinción 7 y extinción 15). Esta falta de sesgo se confirmó estadísticamente al no ser significativa la interacción SESIÓN x EXTINCIÓN ( $F_{36,1350} = 1,041$ ; n.s.) ni ninguna de las dobles interacciones posibles con los otros factores estudiados.

En los animales de la raza Lewis, el número de presiones de palanca es distinto en función del tratamiento desde la primera sesión, haciendo imposible que la interacción sea estadísticamente significativa. Recordamos que las sesiones de autoadministración tenían una duración de 12 horas. Este tiempo parece ser más que suficiente para que las ratas Lewis, especialmente sensibles a los efectos reforzantes de los opiáceos, se adapten al nuevo reforzador en solo una sesión y muestren un comportamiento completamente diferenciado de sus controles salinos, aunque las primeras presiones de palanca se debieran al aprendizaje previo reforzado con comida.

Para culminar el estudio estadístico de este periodo de autoadministración, realizamos análisis de varianza por separado en función del tratamiento. Teniendo en

cuenta solo los salinos encontramos un efecto altamente significativo de la interacción SESIÓN x RAZA ( $F_{18, 612} = 5,789$ ;  $P < 0,001$ ), lo que demuestra que cada cepa desarrolla un patrón conductual distinto a lo largo de las 19 sesiones de autoadministración, a pesar de que todos los animales pertenecían a grupos control y por lo tanto recibían suero salino con cada presión de palanca. Observando la gráfica (figura 27) podemos comprobar como las ratas Fischer 344 salino presionan la palanca más que las Lewis salino durante las 7 primeras sesiones y que esta relación se invierte en la octava sesión. De la sesión 8 a la 19, solo superan las presiones de palanca efectuadas por sus equivalentes Lewis en la sesión 13, en todas las demás sesiones, la media de presiones de palanca es inferior en las ratas Fischer 344. Teniendo en cuenta solo los animales que se autoadministraron morfina, encontramos un efecto global de la RAZA ( $F_{1, 41} = 5,317$ ;  $p < 0,05$ ) mostrando las ratas Lewis mayor media de presión de palanca que las Fischer 344 en todas las sesiones. En cuanto a los efectos intrasujeto, el único efecto significativo lo encontramos en el factor SESIÓN ( $F_{18, 738} = 6,081$ ;  $p < 0,001$ ), no resultando significativo el efecto de ninguna de las interacciones posibles, lo que confirma que los animales varían su conducta de autoadministración del opiáceo a lo largo de las sesiones pero no de manera distinta en función de la raza (en la gráfica podemos observar como ambas cepas siguen evoluciones paralelas aunque separadas).

Observando el periodo de extinción podemos ver como ambas cepas de rata aumentan ligeramente la media de presiones de palanca en la primera sesión respecto a la última sesión de autoadministración, para descender paulatinamente hasta alcanzar el nivel de los salinos. La curva de extinción es mucho más acusada en las Lewis que en las Fischer 344, de manera que estas últimas no alcanzan el nivel de las Lewis hasta la sesión 27 a pesar de partir de un nivel más bajo de presiones de palanca en la última sesión de autoadministración.

Para realizar el ANOVA de medidas repetidas dividimos la extinción en los dos periodos previstos para extraer las muestras biológicas: Extinción 7 (de la sesión 20 a la 26) y Extinción 15 (de la sesión 27 a la 34).

El análisis estadístico del primer tramo de extinción muestra un efecto global del TRATAMIENTO ( $F_{1, 58} = 29,116$ ;  $p < 0,001$ ) y de la interacción RAZA x TRATAMIENTO ( $F_{1, 58} = 5,528$   $p < 0,05$ ) demostrando las diferencias comentadas en la conducta de extinción mostrada por cada raza de rata. Respecto a los efectos intrasujeto, el análisis muestra un efecto significativo de la interacción SESIÓN x TRATAMIENTO ( $F_{6, 348} = 7,189$ ;  $p < 0,001$ ) confirmando que los animales que en las

primeras 19 sesiones se autoadministraron morfina se comportan durante estas 7 sesiones de extinción de manera distinta a los que se autoadministraron salino, y otro efecto significativo de la interacción SESIÓN x EXTINCIÓN ( $F_{6, 348} = 3,056$ ;  $p < 0,05$ ). El factor EXTINCIÓN solo indica, con cada uno de los valores que puede adoptar (extinción 0, 7 y 15), el momento en el que los animales que pertenecen a cada grupo abandonan el experimento para ser sacrificados y extraer de ellos las muestras biológicas, de manera que lo óptimo es que no participen en ningún efecto estadístico significativo pues esto podría suponer que se ha realizado una selección sesgada. Para confirmar que los animales sacrificados tras la sesión 26 (grupo de extinción 7) eran equivalentes, respecto a la medida observada, a los que continuaron 8 sesiones más de extinción (extinción 15), realizamos una t de Student entre ambos grupos en cada una de las sesiones del periodo analizado. El análisis de la sesión 26, la última de los animales del grupo extinción 7, muestra que no hay diferencias entre los grupos ( $t_{16} = 0,948$ ; n.s.) debiéndose el efecto encontrado en el análisis de medidas repetidas a que los animales Lewis morfina extinción 15 presionaron la palanca mucho más que el resto de grupos en la sesión 20 ( $t_{14} = 2,629$ ;  $p < 0,05$ ). El hecho de que la diferencia se produzca solo en la primera sesión de extinción diluye prácticamente por completo el problema de selección sesgada comentado.

El resto de análisis parciales realizado (solo los salinos, solo los morfina, solo los de extinción 7 y solo los de extinción 15) no aporta más luz al análisis, ya que en todos aparece un efecto significativo, y esperado, del factor SESIÓN, y en el análisis de "solo morfina" una interacción SESIÓN x EXTINCIÓN, que se complementa con la interacción encontrada al analizar solo los animales extinción 15, SESIÓN x TRATAMIENTO, y cuya explicación es la misma que la comentada al describir los resultados del ANOVA de medidas repetidas general.

En el último tramo del experimento realizado, entre las sesiones 27 y 34, la gráfica muestra como las líneas de evolución de los cuatro grupos aparecen muy juntas haciendo difícil distinguirlas entre ellas, lo que da una idea de que los animales que en las 19 primeras sesiones se autoadministraron morfina han extinguido esta conducta mostrando una actuación similar a la exhibida por sus controles salinos. Esta suposición queda confirmada por la estadística ya que el análisis de varianza de medidas repetidas no muestra ningún efecto significativo.

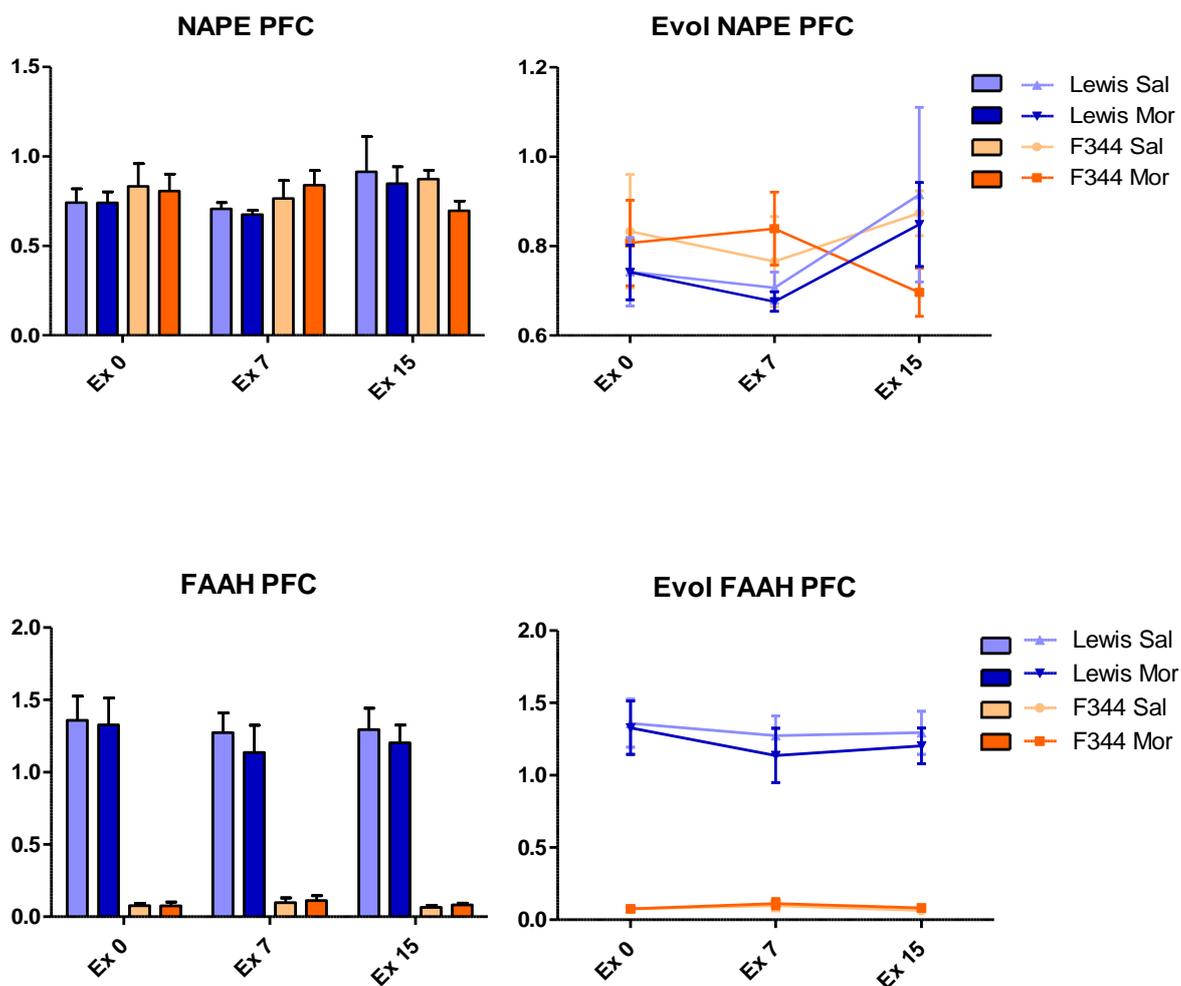
## 5.5. Resultados: qRT-PCR. Influencia de la autoadministración de morfina en la expresión génica de enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides y de sus principales receptores.

A continuación exponemos los resultados obtenidos al realizar PCR en tiempo real con las muestras de tejido obtenidas de los animales del experimento de autoadministración de morfina, para conocer como puede verse afectada por esa conducta la expresión génica de las principales enzimas y receptores del sistema endocannabinoide. Centramos el análisis en dos regiones cerebrales claves del sistema de recompensa, el PFC y el NAcc, y en el bazo para comprobar la influencia en células del sistema inmune.

### 5.5.1. Corteza Prefrontal

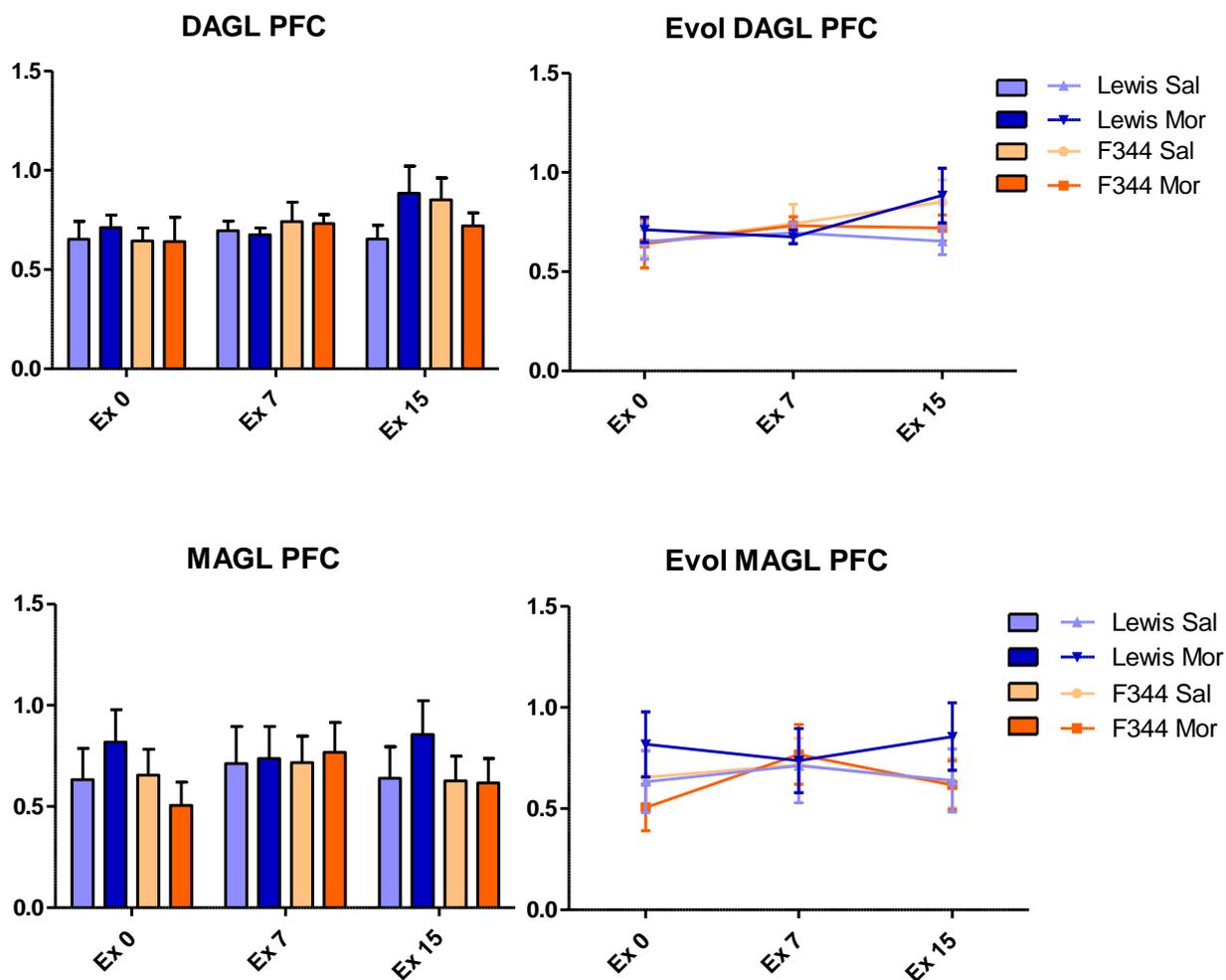
Al analizar los resultados de la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en esta área cerebral, solo encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados en los niveles de ARN mensajero que codifica FAAH. Los resultados del análisis de varianza muestran un efecto global del factor RAZA ( $F_{1, 83} = 524,135$ ;  $p < 0,001$ ), siendo las ratas de la raza Fischer 344 las que presentan un nivel ínfimo de expresión génica de la enzima, comparadas con las ratas de la raza Lewis.

Como puede apreciarse en la gráfica (figura 28) la diferencia es llamativa. También destacamos que no se aprecian diferencias entre las ratas que se autoadministraron morfina y las que se autoadministraron suero salino, ni siquiera en los animales que se sacrificaron al acabar la fase de autoadministración (EX 0), y que la expresión génica de la enzima no varía prácticamente durante el periodo de extinción en ninguna de las dos cepas de rata estudiadas.



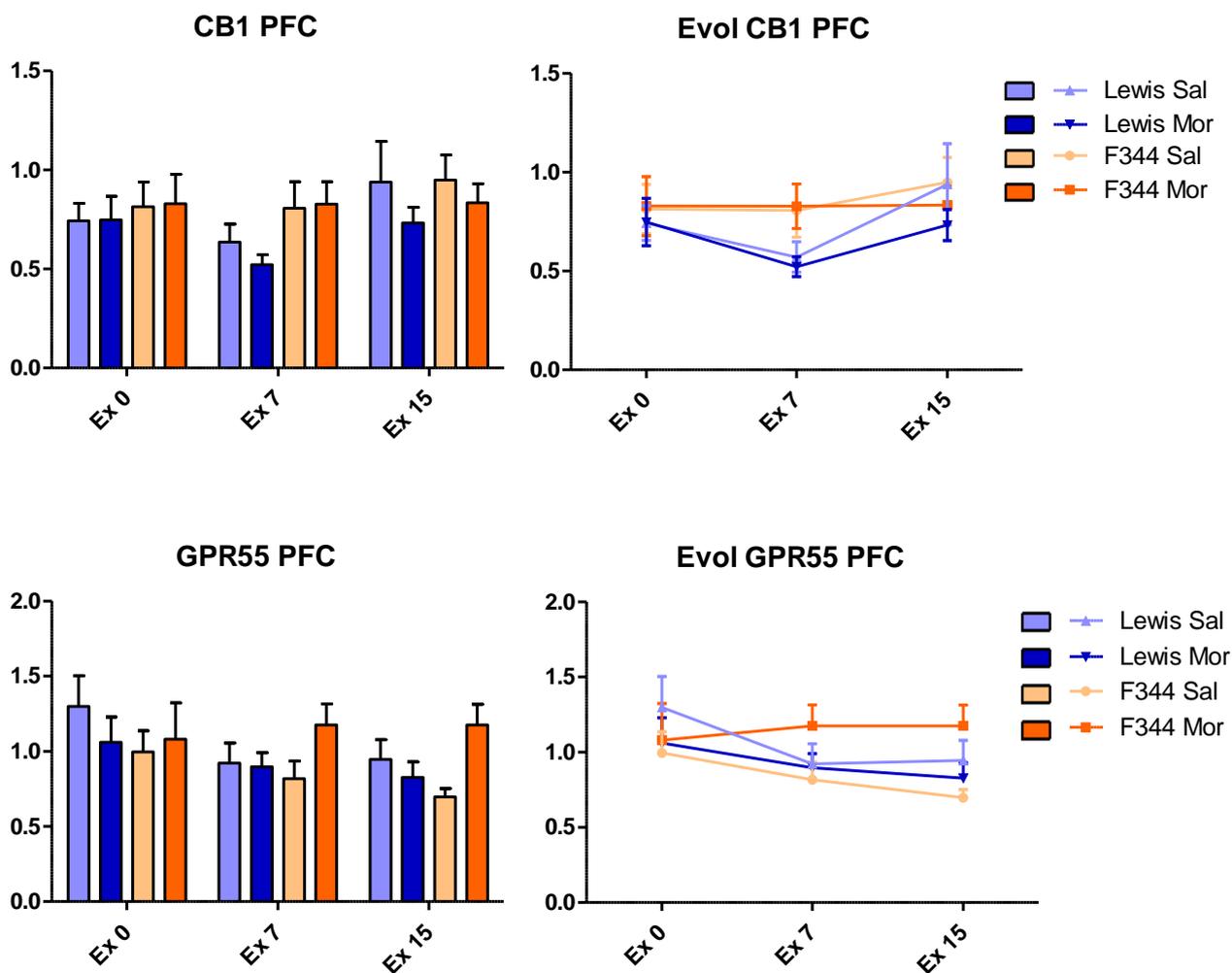
**Figura 28. Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (NAPE) y degradación (FAAH) de la AEA en el PFC.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias de tasa de cambio respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

Esta falta de diferencias en función del tratamiento y entre los tres periodos de extinción estudiados también la encontramos en los niveles de ARN mensajero que codifica NAPE-PLD, principal enzima responsable de la síntesis de AEA, y en los que codifican las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG (DAGL y MAGL respectivamente, figura 29). Consideramos importante esta falta de diferencias, ya que la literatura describe estrechas interrelaciones entre los sistemas opioide y cannabinoide endógenos.



**Figura 29. Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (DAGL) y degradación (MAGL) del 2-AG en el PFC.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias de tasa de cambio respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

En cuanto a la expresión génica de los receptores de cannabinoides estudiados, respecto al CB1, encontramos solo una tendencia del factor RAZA ( $F_{1, 87} = 3,012$ ;  $p = 0,086$ ) ya que, como se aprecia en la gráfica (figura 30) salvo en el grupo Lewis salino extinción 15, los animales de esta raza parecen presentar niveles algo inferiores del ARN mensajero que codifica este receptor, respecto a los niveles expresados por los animales de la raza Fischer 344.

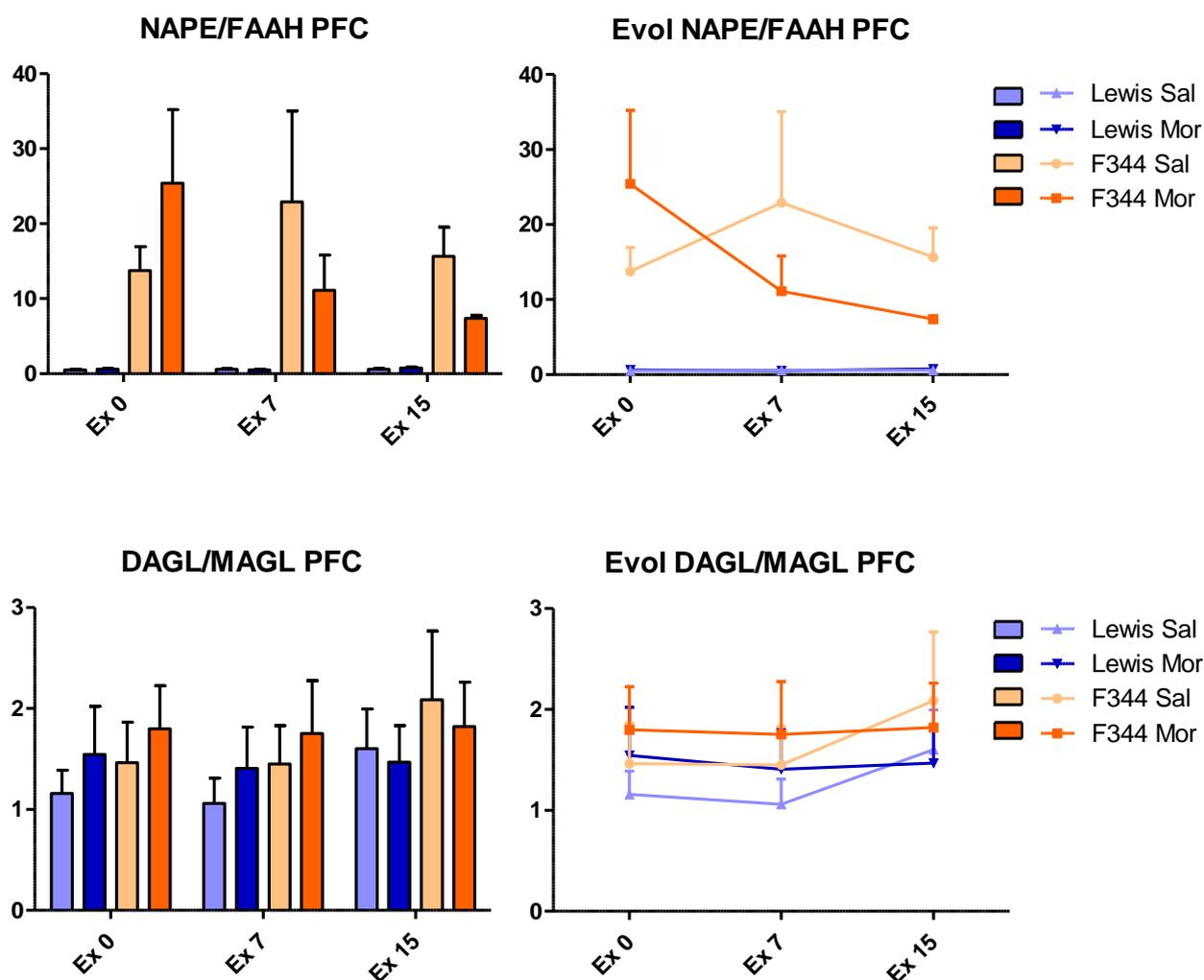


**Figura 30. Expresión génica de los receptores de cannabinoides, CB1 y GPR55 en el PFC.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias de tasa de cambio respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

Respecto al otro receptor estudiado, el GPR55, encontramos un efecto significativo en la interacción RAZA x TRATAMIENTO ( $F_{1, 69} = 6,923$ ;  $p < 0,05$ ) que se muestra solo en los animales de los grupos de extinción 15, donde aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los Fischer 344 que se autoadministraron morfina con respecto a sus controles salinos, mientras que no se aprecian diferencias en función del tratamiento en los animales Lewis.

Al igual que hicimos al estudiar la expresión génica basal (epígrafe 5.2 de Resultados), con el fin de obtener un índice indirecto de los niveles de

endocannabinoides, calculamos la razón entre los niveles de ARNm de las enzimas de síntesis y las de degradación.



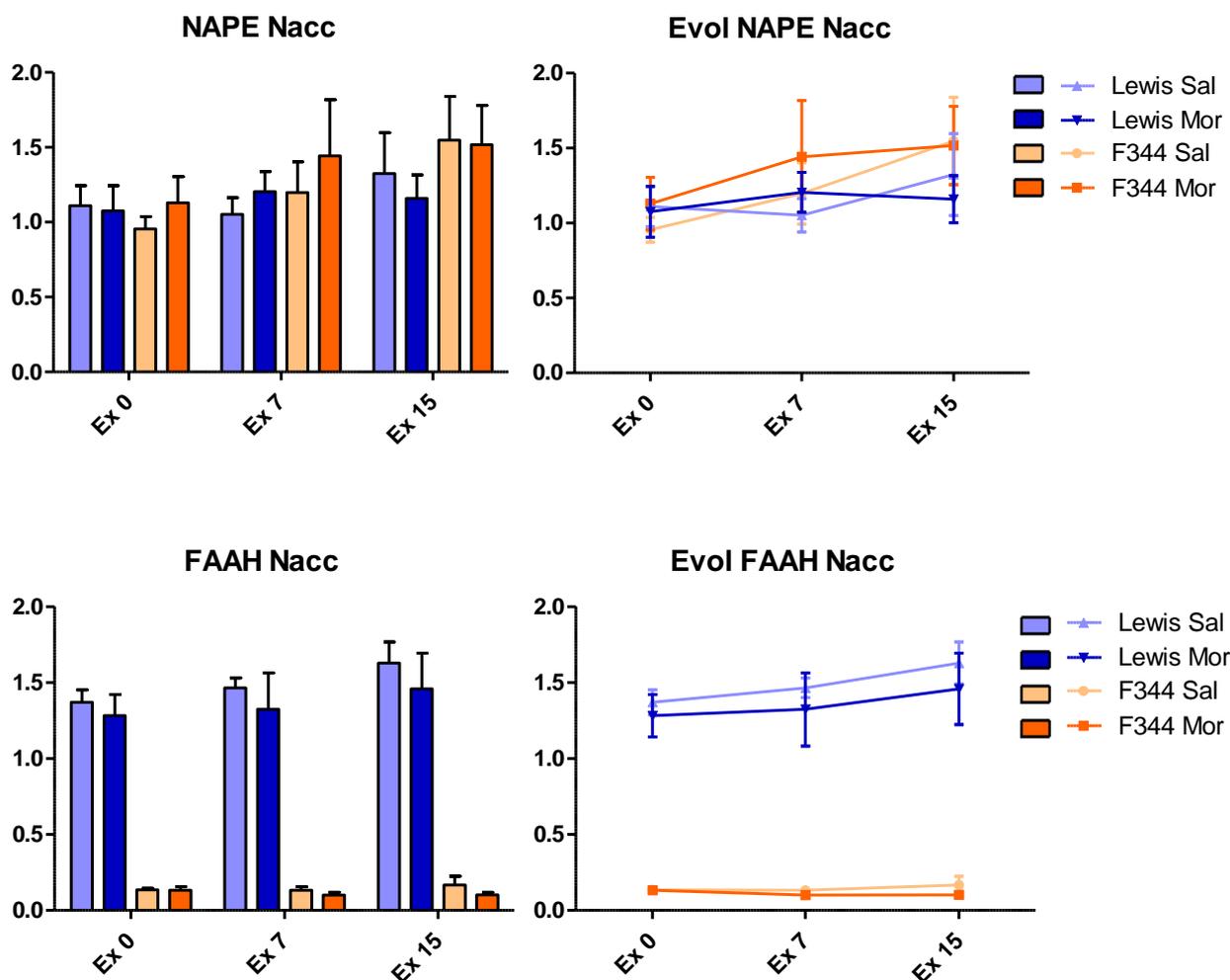
**Figura 31. Relación entre las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en el PFC.** NAPE/FAAH, enzimas de síntesis y degradación de AEA y DAGL/MAGL, enzimas de síntesis y degradación de 2-AG.

Como era de esperar, después de conocer los datos de expresión de cada enzima por separado, el único efecto estadísticamente significativo lo encontramos en la relación entre las enzimas de síntesis y degradación de AEA. La baja expresión de la enzima de degradación que encontramos en los animales de la raza Fischer 344 unida a la similitud de expresión de la enzima de síntesis en ambas razas, nos da un índice indirecto de AEA muy superior en los animales de esta raza respecto a los Lewis. Esta diferencia se muestra estadísticamente como un efecto del factor RAZA

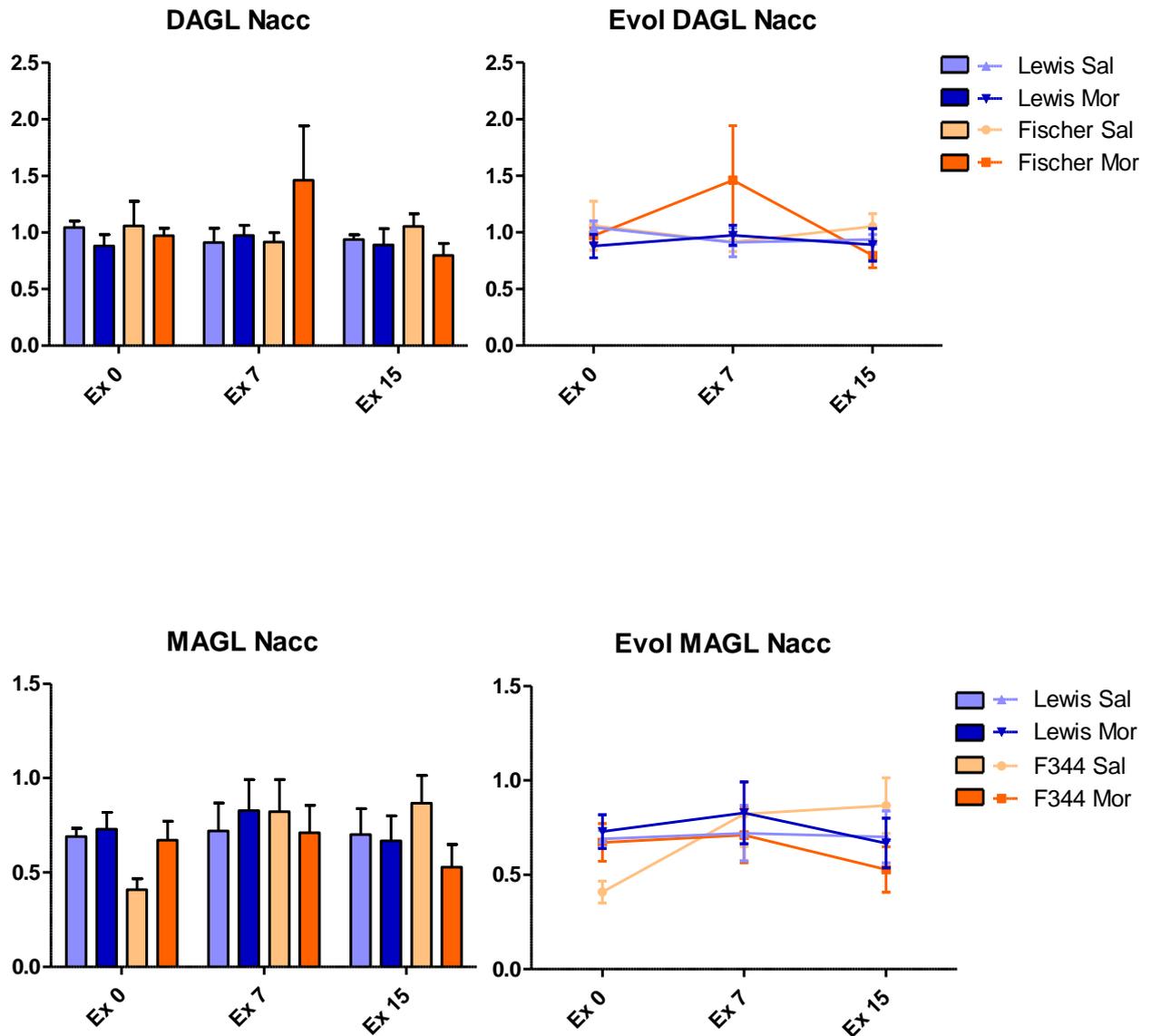
(U= 69; p<0,001). En cuanto al índice indirecto del 2-AG, no encontramos ningún efecto estadísticamente significativo.

### 5.5.2. Núcleo accumbens

En esta estructura cerebral volvemos a encontrar la misma sorprendentemente débil expresión de FAAH en los animales Fischer 344 respecto a los Lewis.



**Figura 32. Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (NAPE) y degradación (FAAH) de la AEA en el NAcc.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias de tasa de cambio respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.



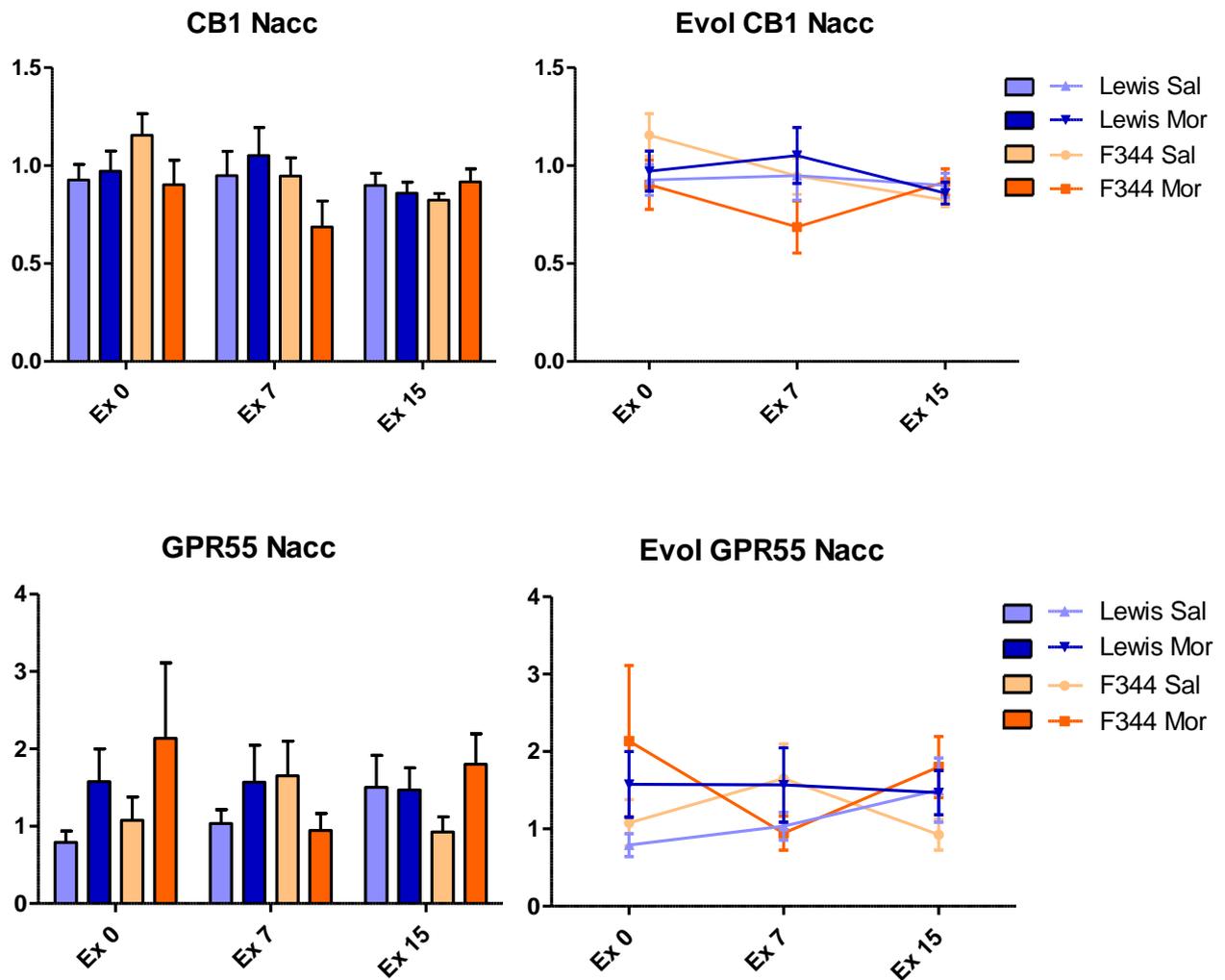
**Figura 33. Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (DAGL) y degradación (MAGL) del 2-AG en el NAcc.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias de tasa de cambio respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

Igual que sucede en el cortex prefrontal, en la expresión génica de la principal enzima responsable de la síntesis de AEA no encontramos ninguna diferencia significativa y sí encontramos una gran diferencia en la expresión génica de su enzima de degradación, que vuelve a manifestarse solo en función de la raza (factor RAZA ( $\chi^2_{11} = 68,148$ ;  $p < 0,001$ )).

En cuanto a la expresión génica de las enzimas relacionadas con el 2-AG, en un primer análisis no encontramos ningún efecto significativo. Atendiendo a lo mostrado en la gráfica (figura 33), realizamos un segundo análisis de los datos

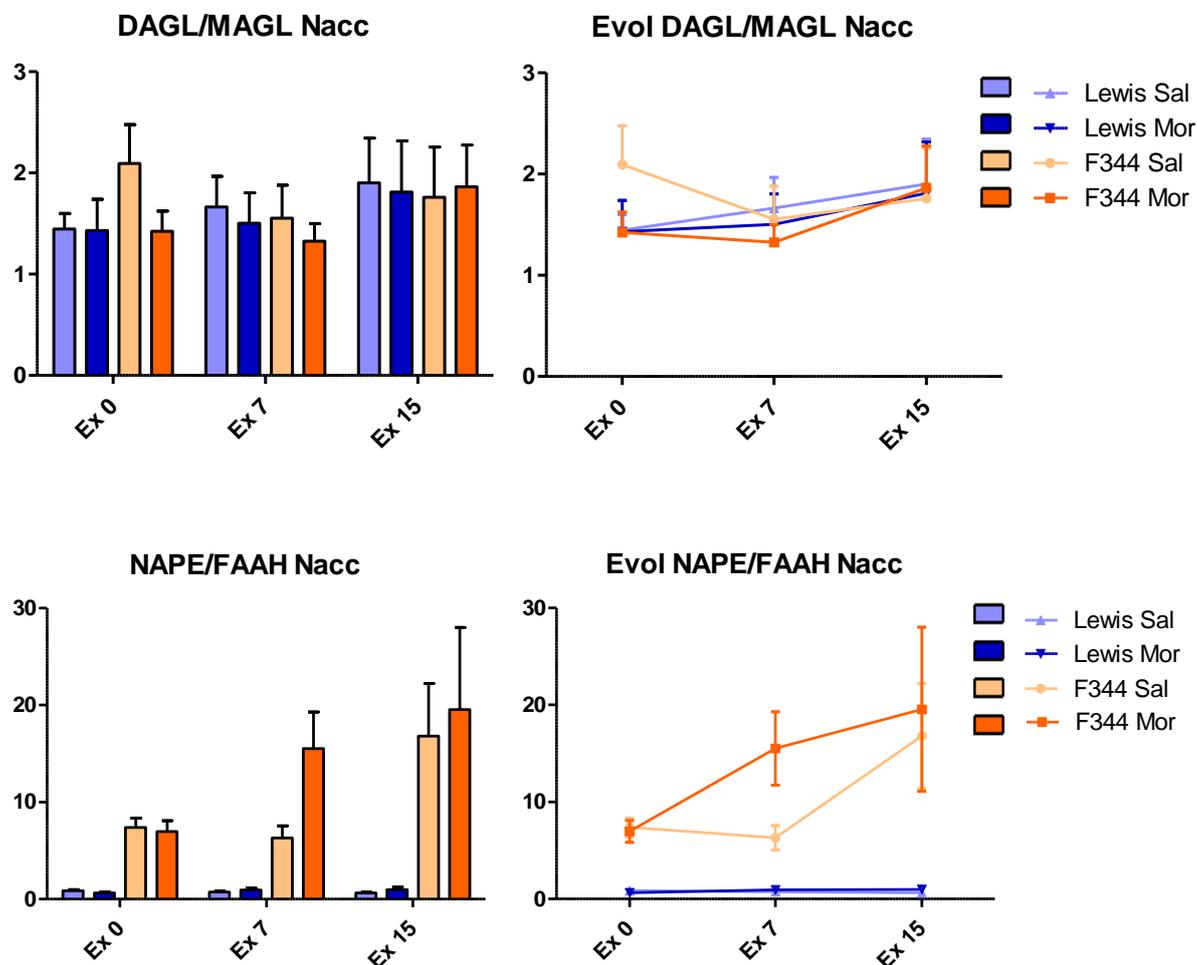
referentes a la expresión de MAGL teniendo en cuenta solo los animales sacrificados al finalizar la autoadministración (EX 0) y encontramos un efecto del factor RAZA ( $F_{1,30} = 4,633$ ;  $p < 0,05$ ) y una tendencia del factor TRATAMIENTO ( $F_{1,30} = 3,636$ ;  $p = 0,066$ ) que dependen fundamentalmente de la menor expresión de esta enzima en las Fischer 344 salino.

Respecto a la expresión génica de los receptores de cannabinoides estudiados, no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en este núcleo cerebral (Figura 34).



**Figura 34. Expresión génica de los receptores de cannabinoides, CB1 y GPR55 en el NAcc.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

Al estimar indirectamente los niveles de producción de los principales endocannabinoides, a través de la razón enzima de síntesis/enzima de degradación, volvemos a encontrar un nivel de AEA elevado en las ratas de la cepa Fischer 344 respecto a las Lewis.

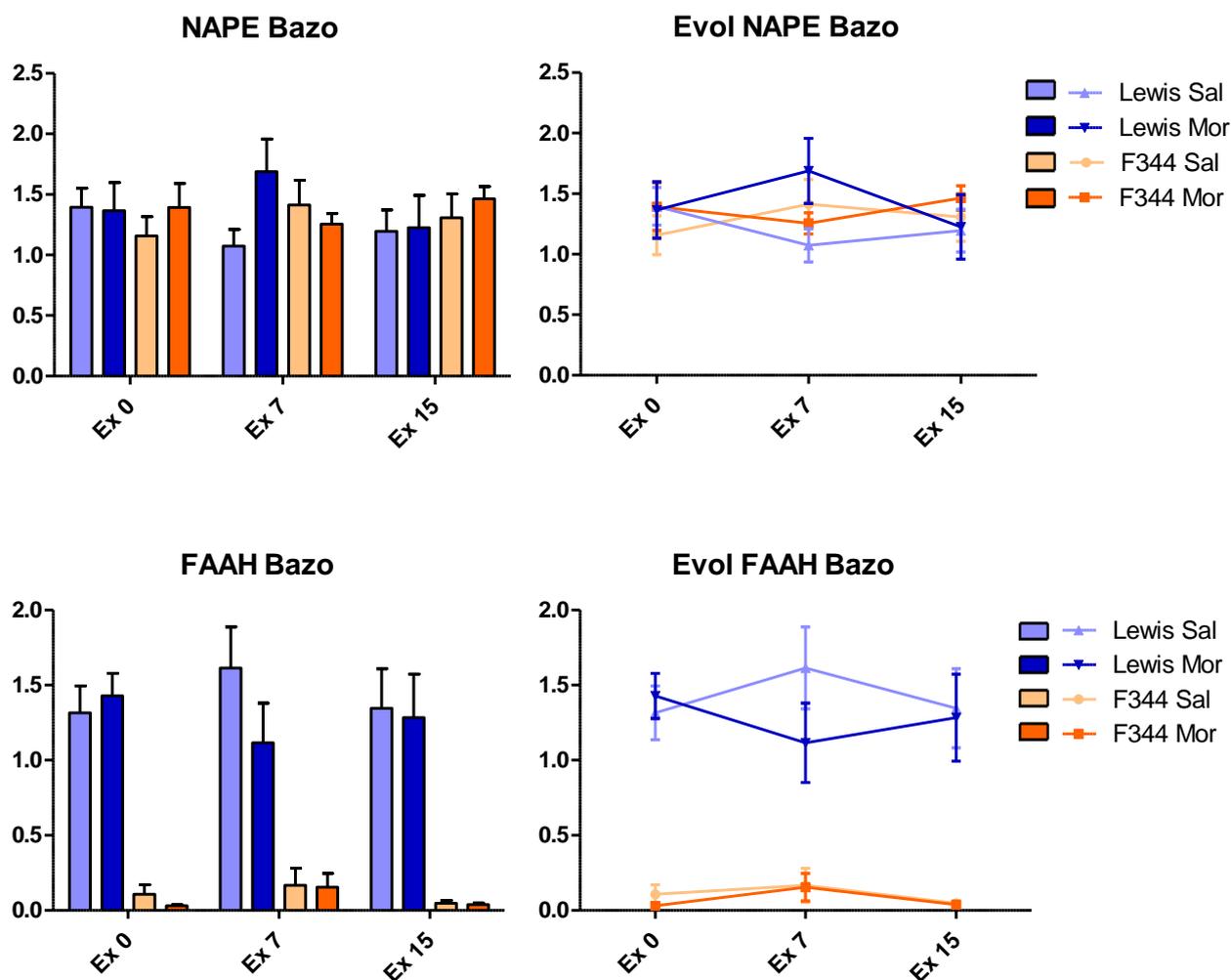


**Figura 35. Relacion entre las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en el NAcc.** NAPE/FAAH, enzimas de síntesis y degradación de AEA y DAGL/MAGL, enzimas de síntesis y degradación de 2-AG.

El análisis de varianza de la razón NAPE/FAAH muestra un efecto significativo del factor RAZA ( $F_{1, 84} = 117,208$ ;  $p < 0,001$ ) que ratifica estadísticamente esta mayor producción neta de AEA de las Fischer 344 respecto a las Lewis en el NAcc. No encontramos ninguna diferencia significativa en el índice indirecto de producción neta de 2-AG (Figura 35).

### 5.5.3. Bazo

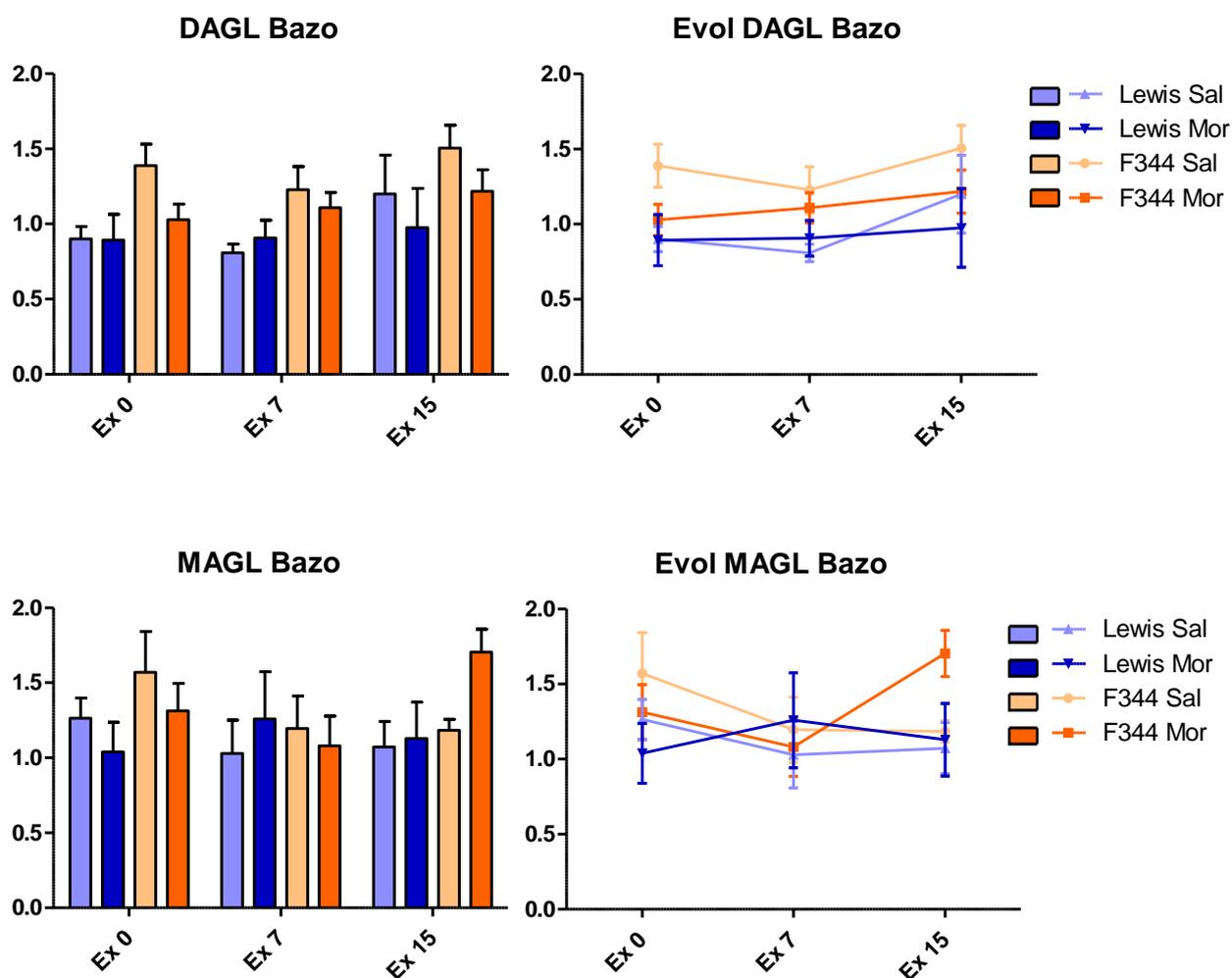
Para estudiar los posibles efectos de la autoadministración de morfina sobre parámetros del sistema endocannabinoide de poblaciones celulares del sistema inmune, realizamos los mismos análisis por qRT-PCR que los realizados en tejido cerebral pero con muestras de bazo.



**Figura 36. Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (NAPE) y degradación (FAAH) de la AEA en esplenocitos.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

Volvemos a encontrar, ahora en muestras del sistema inmune, una expresión génica de FAAH muy inferior en Fischer 344 respecto a Lewis y una expresión de NAPE sin diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados. El ANOVA realizado respecto a la principal enzima de degradación de AEA muestra un efecto del

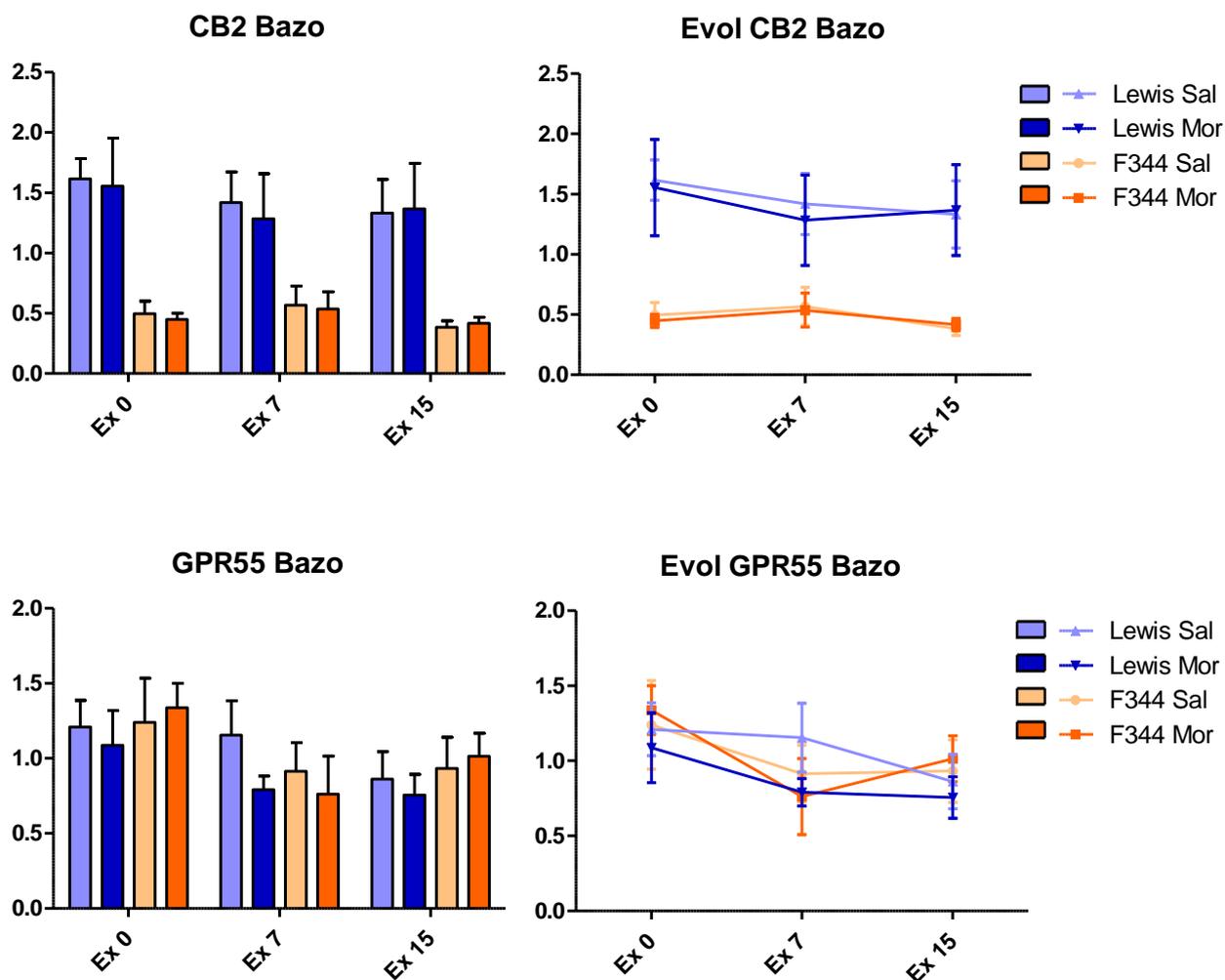
factor RAZA ( $F_{1,82} = 659,731$ ;  $p < 0,001$ ) corroborando estadísticamente lo apreciado al observar la gráfica (Figura 36).



**Figura 37. Expresión génica de las principales enzimas responsables de la síntesis (DAGL) y degradación (MAGL) del 2-AG en esplenocitos.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

El análisis estadístico de la expresión génica de las enzimas responsables de regular la producción de 2-AG muestra una expresión mayor, en la cepa Fischer 344 respecto a la cepa Lewis, tanto de DAGL, efecto del factor RAZA ( $U = 709$ ;  $p < 0,001$ ), como de MAGL ( $U = 907$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 37).

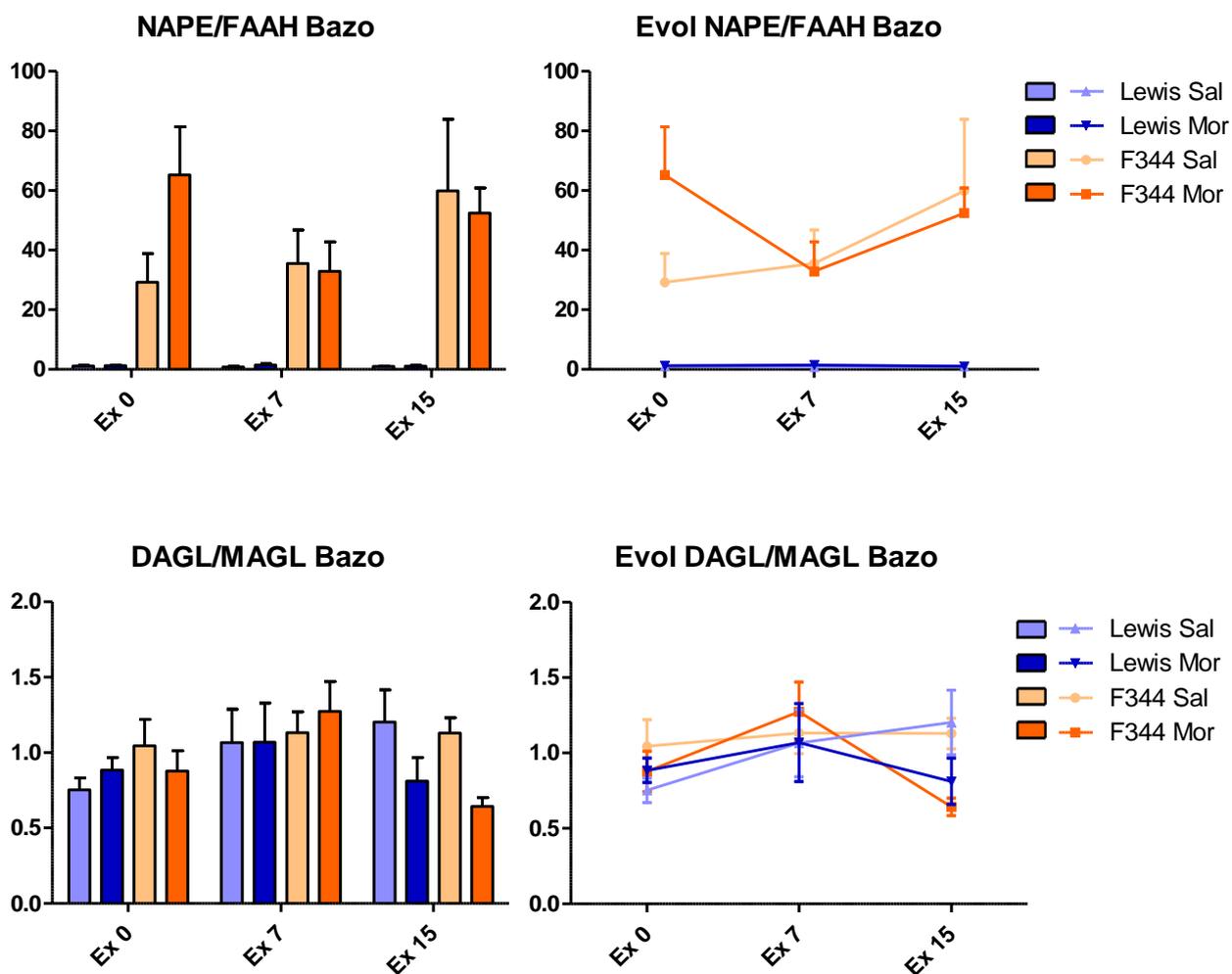
En cuanto al análisis de la expresión génica de receptores cannabinoides, al ser tejido del sistema inmune, estudiamos el CB2 y el GPR55.



**Figura 38. Expresión génica de los receptores de cannabinoides, CB2 y GPR55 en esplenocitos.** Los datos se muestran en unidades arbitrarias respecto a un pool de 40 muestras que incluía representantes de todos los grupos estudiados.

El ANOVA respecto al principal receptor cannabinoide a nivel periférico, el CB2, muestra un efecto significativo del factor RAZA ( $F_{1, 89} = 33,206$ ;  $p < 0,001$ ) siendo los animales de la raza Fischer 344 los que, como ocurre con FAAH en todas las regiones estudiadas, expresan más débilmente el receptor. Por el contrario, no encontramos diferencias significativas en la expresión de GPR55 entre ninguno de los grupos estudiados (Figura 38).

Finalizamos la exposición de los datos mostrando los resultados obtenidos al analizar, como índices indirectos de producción neta de endocannabinoides, las razones entre las expresiones génicas de las enzimas de síntesis y de degradación.



**Figura 39. Relacion entre las expresiones génicas de las enzimas de síntesis y degradación de los principales endocannabinoides en esplenocitos.** NAPE/FAAH, enzimas de síntesis y degradación de AEA y DAGL/MAGL, enzimas de síntesis y degradación de 2-AG.

Al estudiar estas razones de síntesis/degradación, volvemos a encontrarnos el reflejo de la pobre expresión de FAAH en las ratas de la raza Fischer 344. Así, el ratio relacionado con la producción neta de AEA (NAPE/FAAH) muestra un efecto significativo del factor RAZA ( $F_{1, 88} = 268,689$ ;  $p < 0,001$ ) demostrando que también en células inmunes la raza Fischer 344 parece tener una producción neta de AEA mayor que la raza Lewis (Figura 39).

Respecto a la razón relacionada con la producción de 2-AG, en un primer análisis no encontramos ningún efecto significativo, pero observando la gráfica detenidamente (Figura 39) decidimos realizar un análisis de varianza de los datos obtenidos con los grupos de extinción 15 solamente. Como esperábamos, el análisis

mostró un efecto significativo del factor TRATAMIENTO ( $F_{1, 29} = 5,581$ ;  $p < 0,05$ ) demostrando estadísticamente que los animales que se autoadministraron morfina, tras 15 días de extinción, muestran un índice indirecto de producción neta de 2-AG significativamente menor que sus controles salinos.

## 6. DISCUSIÓN

---

### 6.1. Parámetros del sistema endocannabinoide de las razas de rata Lewis y Fischer 344 a nivel basal.

En el primer experimento de esta tesis, la autorradiografía cuantitativa de receptores cannabinoideos, llama la atención el hecho de que de las 38 regiones cerebrales estudiadas, solo en una, el núcleo lateral del globo pálido (LGP), encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas de rata en estudio. Las ratas de la cepa Fischer 344 muestran un nivel de fijación del agonista cannabinoide tritiado a sus receptores, muy superior al encontrado en los animales de la raza Lewis. En anteriores estudios realizados en nuestro laboratorio sobre las diferencias entre estas razas de rata respecto al sistema opioide endógeno (Sánchez-Cardoso et al., 2007), encontramos diferencias en la densidad de receptores  $\mu$  en este mismo núcleo (LGP) y en la misma dirección que los encontrados ahora: los animales de la raza Fischer 344 mostraron mayor densidad de receptores que los de la raza Lewis. El hecho de que encontremos esta sobreexpresión de receptores, tanto cannabinoideos como opioides, en el mismo núcleo cerebral, concuerda con la cada vez más abundante evidencia científica de que ambos tipos de receptores colocan a menudo en las mismas poblaciones celulares (Salio et al., 2001; Rodríguez et al., 2001; Pickel et al., 2004) y formando heterodímeros  $\mu$ -CB1 en muchas ocasiones (Mackie, 2005; Rios et al., 2006; Schoffelmeer et al., 2006; Hojo et al., 2008).

El núcleo lateral del globo pálido interconecta varios núcleos de los ganglios basales involucrados en diversos aspectos del control de la conducta motora (Alexander y Crutcher, 1990; Parent y Hazrati, 1995). Este control parece depender del balance entre sistemas excitatorios e inhibitorios, y la presencia del receptor cannabinoide CB1 podría intervenir modulando este balance ejerciendo acciones sobre los neurotransmisores implicados (Alexander y Crutcher, 1990). El núcleo lateral del globo pálido recibe aferencias GABAérgicas procedentes del estriado y proyecta eferencias, también GABAérgicas, hacia el núcleo subtalámico, el núcleo medial del globo pálido y la sustancia negra pars reticulata (Alexander y Crutcher, 1990; Parent y Hazrati, 1995). Los receptores CB1 presentes en el núcleo lateral del globo pálido, se localizan principalmente a nivel presináptico (Herkenham et al., 1991; Westlake et al., 1994) y su activación por un agonista tendría como principal efecto la inhibición de la neurotransmisión (Gessa et al., 1997; Maneuf et al., 1996a; Maneuf et al., 1996b; Schlicker y Kathmann, 2001; Szabo et al., 1998; Tsou et al., 1998). La mayor concentración de receptores de cannabinoideos en las ratas F344 podría indicar en esta raza, un mayor tono GABAérgico en este circuito en comparación con las LEW, y esto

podría explicar, al menos en parte, el hecho de que las LEW adquieran más rápidamente y a dosis más bajas que las F344 la conducta de autoadministración de morfina y de cocaína (Ambrosio et al., 1995). Este hecho también podría ayudar a explicar por qué la raza LEW adquiere más rápidamente que la raza F344 conductas operantes, utilizando un reforzador natural como es la comida (Kosten y Bombace, 2001), sin que ello se deba a diferencias en la habilidad para aprender o ejecutar tareas operantes en general (Martin et al., 1999).

Sin desdeñar la importancia de los resultados obtenidos en el experimento de autorradiografía cuantitativa, teniendo en cuenta las diferencias encontradas entre estas razas de rata respecto a los efectos reforzantes del THC (Lepore et al., 1996), fue sorprendente no encontrar una expresión diferencial de receptores cannabinoides en áreas clave del sistema de recompensa, como son el PFC y el NAcc. Así, con el fin de buscar sutiles diferencias en el sistema endocannabinoide en estos núcleos cerebrales, estudiamos la expresión de los genes que codifican el receptor CB1, el receptor de lisofosfatidilinositol GPR55 (muchas veces postulado como el tercer receptor cannabinoide) y las principales enzimas de síntesis y degradación de AEA y 2-AG, midiendo los niveles de ARN mensajero a través de PCR en tiempo real.

Calculando de manera indirecta, a través de la razón síntesis/degradación, los niveles de endocannabinoides en estas áreas cerebrales, no encontramos diferencias en la producción neta de 2-AG en ninguna de las dos áreas analizadas. Aunque en el cortex prefrontal las ratas de la raza Fischer 344 muestran una menor expresión génica de MAGL, esta diferencia se compensa con una menor producción de DAGL, que, aunque no es estadísticamente significativa, es suficiente para anular las diferencias al calcular la razón.

Respecto al otro endocannabinoide, encontramos que los animales Fischer 344 muestran niveles más elevados de producción neta de AEA que los Lewis en las dos áreas estudiadas. Esta sobreproducción de AEA podría estar compensada en el PFC por la menor expresión génica del receptor CB1 encontrado en las ratas Fischer 344. Esta posible compensación no se da en el NAcc, en donde el mayor nivel de AEA podría ayudar a explicar las diferencias encontradas entre Lewis y Fischer 344 en cuanto a su conducta emocional (Kosten and Ambrosio, 2002; Viveros et al., 2007) o en cuanto a la expresión génica del receptor  $\mu$  y de la proencefalina (Sánchez-Cardoso et al., 2007), dada la capacidad de modulación directa del sistema opioide mostrada por los cannabinoides (Corchero et al, 1997a, Corchero et al., 1997b; Manzanares et al., 1998) . En estudios previos en nuestro laboratorio, utilizando

también como índice indirecto de producción de AEA la razón NAPE-PLD/FAAH, pero midiendo los niveles de proteínas por técnicas inmunohistoquímicas, encontramos una mayor producción neta de AEA en el área CA3 del hipocampo de las ratas Fischer 344 respecto al de las ratas Lewis (Rivera et al., 2013). Este hecho apoya la idea de que las diferencias encontradas en la expresión génica de las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides puedan trasladarse a diferencias en los niveles directos de proteínas, aunque será necesario corroborarlo con la medición de las enzimas en el PFC y en el NAcc de las ratas Fischer 344 y Lewis.

En cuanto a los mecanismos responsables de esta diferencia en la producción neta de AEA, es tentador conjeturar una posible modulación dopaminérgica. Teniendo en cuenta la capacidad que muestra esta monoamina para disminuir los niveles de AEA a través de la estimulación de los receptores D1 (Patel et al., 2003) y que los animales de la raza Fischer 344 muestran un nivel elevado de DOPAC en el PFC (Lindley et al., 1999) y un mayor nivel basal extracelular de metabolitos de dopamina en el NAcc (Camp et al., 1994; Strecker et al., 1995), podríamos especular con una mayor metabolización de dopamina, y por lo tanto una menor inhibición en la producción de AEA, en los animales de esta cepa respecto a los de la cepa Lewis, pero es necesario realizar más investigaciones a este respecto para que el razonamiento sea concluyente.

## **6.2. Conducta de autoadministración de WIN 55,212-2, de morfina y extinción de estas conductas en ratas Lewis y Fischer 344.**

Una vez realizado el análisis de los parámetros del sistema endocannabinoide a nivel basal, el siguiente paso fue intentar conseguir la autoadministración de un agonista cannabinoide en las cepas de rata de nuestro modelo de vulnerabilidad/resistencia (Lewis/Fischer 344) a las drogas de abuso (Kosten y Ambrosio 2002). Pero los esfuerzos realizados en esta dirección no rindieron los frutos deseados. Los resultados de este trabajo indican que las cepas de ratas LEW y F344 no adquieren, ni por lo tanto mantienen, una conducta consistente de autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 en nuestras condiciones experimentales. El número de presiones de palanca activa fue progresivamente disminuyendo a lo largo de las sesiones y además no se mantuvo una regularidad entre ellas (uno de los criterios establecidos para poder hablar de autoadministración estable con esta droga; (Fattore et al., 2001)). Con cada cambio significativo en el programa de condicionamiento (duplicación de la duración de las sesiones y sustitución de la droga por vehículo) se produce un incremento en el número de presiones de la palanca activa que, lejos de mantenerse, disminuye progresivamente hasta alcanzar los niveles de presión de la palanca inactiva, dibujando de este modo un patrón conductual típico de extinción en cada una de las tres fases del programa (adquisición, mantenimiento y extinción). Entre otras posibles explicaciones a la falta de regularidad en los patrones de autoadministración encontrados en nuestro experimento, consideramos que debería tenerse en cuenta la naturaleza lipofílica del agonista cannabinoide, que, aun teniendo una vida media inferior a la de otros cannabinoides (Aceto et al., 2001; Oliva et al., 2003), hace que el compuesto se acumule en el tejido adiposo y de él se libere con posterioridad a su administración, dificultando la posibilidad de establecer relaciones directas entre la dosis autoadministrada en cada sesión y sus efectos.

Es interesante señalar, sin embargo, que las diferencias entre las presiones de palanca activa e inactiva muestran que ambas cepas discriminan los efectos del WIN 55,212-2, indicando que esta droga podría estar actuando como un reforzador positivo, al menos en las primeras sesiones. En esta dirección también parece apuntar el incremento en presiones de la palanca activa el primer día de extinción, aunque, como comentamos al exponer los resultados, al no existir un número elevado y estable de presiones de esta palanca durante la fase de mantenimiento y, por lo tanto, no poder considerar establecida la conducta de autoadministración, no podemos decir que dicha

conducta se extinga. Por otro lado, comparando los patrones de autoadministración entre ambas cepas, la única diferencia reseñable la encontramos en su respuesta a la inyección del antagonista cannabinoide AM251, de forma que las F344 disminuyeron significativamente las presiones de la palanca activa mientras que en las LEW no parece que produjera efecto conductual alguno. Teniendo en cuenta que el AM251 es antagonista/agonista inverso de los receptores CB1 (Felder et al., 1998; Gatley et al., 1996; Pertwee et al., 1995), esta diferencia en la respuesta al antagonista cannabinoide entre estas dos razas podría indicar que, tras 19 sesiones de autoadministración de WIN 55,212-2, en las ratas F344 puede existir una mayor implicación de los receptores CB1 en la determinación de la conducta de autoadministración del aminoalquilindol que en las LEW. Esto podría obedecer a neuroadaptaciones en los receptores CB1 como consecuencia de la exposición prolongada al agonista cannabinoide (Corchero et al., 1999; Sim et al., 1996). Ahora bien, el AM251 también actúa como agonista de los receptores GPR55 (Ryberg et al., 2007; Henstridge et al., 2010; Brown et al., 2011; Kapur et al., 2009) por lo que cabría pensar en la activación directa de este receptor, o en efectos combinados sobre ambos receptores, como causa explicativa del cambio conductual observado; pero si se confirmasen en vivo los resultados publicados a finales de 2012, sobre interacciones entre estos dos receptores en cultivos celulares con células en las que se coexpresan (Karg et al., 2012), que muestran como el GPR55 está inhibido cuando el CB1 no está activado, al impedir el AM251 la activación de este último, no habría lugar para atribuir un papel al GPR55 en la explicación de la disminución de la conducta de autoadministración del cannabinoide sintético.

En los estudios sobre autoadministración de cannabinoides en ratas que se habían realizado cuando comenzamos nuestro experimento, sólo se había conseguido establecer una conducta consistente de autoadministración, y utilizando WIN 55,212-2, en dos cepas: Long Evans (Fattore et al., 2001) y Lister Hooded (Deiana et al., 2007). En este último estudio, también se intentó, sin conseguirlo, establecer la conducta de autoadministración en ratas de la raza Sprague-Dawley, hito logrado recientemente por el grupo de Di Chiara, pero utilizando el endocannabinoide 2-AG en lugar del aminoalquilindol (De Luca et al., 2014). Las diferencias encontradas en la autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 en ratas, entre estos estudios y el nuestro, podrían atribuirse a diferencias genéticas en la vulnerabilidad al consumo de cannabinoides, sin embargo, existen también grandes diferencias procedimentales que podrían influir en la disparidad de resultados. Así, las ratas utilizadas en los estudios de Fattore et al. fueron sometidas a restricción alimentaria hasta alcanzar el 80% de su

peso ad libitum, mientras que las utilizadas en nuestro experimento se mantuvieron entre el 90 y el 95%. Por otro lado, en el trabajo citado las sesiones de autoadministración tuvieron una duración de 3 horas cada una, mientras que en el presente estudio fueron de 1 hora en la fase de adquisición y de 2 horas en la fases de mantenimiento. Además, Fattore y colaboradores programaron un intervalo de tiempo fuera de 5 segundos tras los 5 segundos que duraba la infusión de la dosis (Fattore et al., 2001), mientras que en nuestro estudio el intervalo fue de 15 segundos tras 15 segundos de infusión.

Al no conseguir una conducta estable de autoadministración del agonista cannabinoide en las dos cepas de rata de nuestro estudio y comprobar cómo el estado físico de los animales se deterioraba palpablemente con el paso de las sesiones, consideramos que el procedimiento resultaba muy agresivo, al menos para estas razas de rata, y decidimos dar un giro a la investigación y profundizar en el conocimiento del sistema endocannabinoide a través de una estrategia indirecta: estudiar cómo afecta al sistema endocannabinoide la autoadministración de morfina y la extinción de esa conducta en ratas Lewis y Fischer 344, que en estudios anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado ser un modelo consistente de vulnerabilidad/resistencia a la autoadministración de sustancias opioides.

La conducta de autoadministración que mostraron fue la esperada confirmando lo descrito en la literatura científica. Las ratas de la cepa Lewis adquieren una conducta estable de autoadministración de morfina antes y se autoadministran más morfina que las ratas de la cepa Fischer 344 (Ambrosio et al., 1995; Martin et al., 1999; Suzuki et al., 2001; Sánchez-Cardoso et al., 2009; García-Lecumberri et al., 2011) y aunque ambas cepas extinguen esta conducta, las ratas Lewis lo hacen también más rápido que las ratas Fischer 344 (Ambrosio et al., 1995; Martin et al., 1999; Sánchez-Cardoso et al., 2009).

Como comentamos en el apartado dedicado a exponer los resultados, la gráfica obtenida con los datos conductuales de nuestro experimento es la prototípica del paradigma vulnerabilidad/resistencia a la *adquisición* de la conducta de autoadministración de sustancias con potencial de abuso, y remarcamos adquisición porque es en esa fase en la que el modelo muestra toda su potencia. Si bien adquirir una conducta de autoadministración es un paso necesario para desarrollar una conducta de adicción a drogas, no todo aquel que la adquiere desarrolla una adicción y nuestro protocolo no modeliza los criterios necesarios para evaluar la conducta adictiva. Para ello, nuestro modelo debería poder comprobar si los animales cumplen

tres criterios esenciales para diagnosticar adicción: dificultad para parar o limitar la toma de droga, motivación exacerbada por tomar la droga y continuidad en su consumo a pesar de las consecuencias adversas que conlleva (Deroche-Gamonet et al., 2004). Los animales de nuestro experimento permanecían aislados desde la operación para implantarles el catéter hasta su sacrificio y no salían de su caja hogar más que para entrar en la de condicionamiento operante y existe evidencia científica que demuestra que las ratas aisladas y alojadas en ambientes no enriquecidos son propensas a adquirir la conducta de autoadministración de drogas (Puhl et al., 2012). Aun así, y teniendo en cuenta estas limitaciones, es evidente que las ratas de ambas cepas, después de ser entrenadas reforzando su conducta con comida, presionan la palanca que les proporciona una dosis de morfina más que sus controles salinos, aunque mientras las de la raza Lewis presionan más que los salinos desde la primera sesión, los de la raza Fischer 344 no presionan claramente más que sus controles salinos hasta la quinta sesión, lo que parece ser indicativo de una mayor sensibilidad de los animales Lewis a los efectos reforzante de la morfina (Ambrosio et al., 1995; Martin et al., 1999). Pero no debemos olvidar que lo que medimos en la autoadministración de morfina es una conducta operante, y que las ratas Lewis adquieren antes que las Fischer 344 una conducta operante reforzada con comida (Kosten y Bombace, 2001), lo que encaja con que los animales de esta última raza tengan un tono GABAérgico elevado en los ganglios basales, tal y como se comenta al discutir los datos obtenidos en nuestro experimento de autorradiografía cuantitativa. Si además tenemos en cuenta que en nuestro experimento, al igual que en otros anteriores, las ratas de la cepa Lewis muestran una curva de extinción más pronunciada (Ambrosio et al., 1995; Martin et al., 1999; Sánchez-Cardoso et al., 2009), y las diferencias encontradas entre ambas cepas de rata en fenómenos electrofisiológicos relacionados con plasticidad cerebral como la potenciación y la depresión a largo plazo (Prakash et al., 2009) y en los cambios inducidos en la densidad de espinas por autoadministración de cocaína (Miguens et al., 2015) no resulta arriesgado sugerir, añadiendo una perspectiva nueva que no invalida las apreciaciones anteriores, que los animales de la raza Fischer 344 muestran menos plasticidad cerebral que los animales de la raza Lewis. En esta dirección parecen apuntar las diferencias basales encontradas entre estas razas por el grupo de Sato en una estructura cerebral estrechamente relacionada con la conducta de autoadministración como es el estriado, donde describen la tendencia de las ratas Lewis respecto a las Fischer 344 a exhibir mayores niveles del ARN mensajero que codifica HSP $\beta$ 90, una proteína que reduce su expresión con el envejecimiento (Numachi et al., 2000). De este modo, las ratas Fischer 344 tardarían más que las Lewis en adaptarse

a un cambio en el reforzador, tanto en las primeras sesiones de autoadministración de morfina respecto al aprendizaje previo con comida, como al sustituir la droga por suero salino en la fase de extinción.

### **6.3. Influencia de la autoadministración de morfina en la expresión génica de enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides y de sus principales receptores.**

Observando los resultados de la expresión génica de parámetros del sistema endocannabinoide con muestras extraídas de los 12 grupos que componían nuestro experimento de autoadministración de morfina, lo primero que capta nuestra atención es que, principalmente, encontramos de nuevo las mismas diferencias que descubrimos a nivel basal en las áreas cerebrales, y su reflejo en periferia al estudiar las muestras de bazo. Las ratas de la cepa Fischer 344 muestran una menor expresión génica de FAAH que las de la cepa Lewis y mantienen niveles similares de expresión de NAPE-PLD, lo que hace que al estimar indirectamente el nivel de AEA a través de la razón NAPE-PLD/FAAH (síntesis/degradación) éste sea mucho mayor en las ratas Fischer 344 que en las Lewis. Estas diferencias se muestran en todas las áreas estudiadas y no se ven modificadas por el tratamiento, es decir, son diferencias constitutivas, en función de la raza, y no varían por autoadministrarse morfina, ni por extinguir esta conducta.

De las dos áreas cerebrales estudiadas, en el PFC encontramos algunas diferencias respecto a la expresión génica basal, pero que tampoco varían en función del tratamiento. Así, la mayor expresión génica en las ratas Fischer 344 de la enzima que degrada el 2-AG, la MAGL, y la tendencia que mostraba esta raza en esta región a sobreexpresar el ARNm que codifica la DAGL respecto a las ratas Lewis, no aparecen en este estudio. También desaparece la menor expresión génica del receptor CB1 de las ratas Fischer 344, apareciendo una tendencia en sentido contrario, siendo las ratas Lewis las que muestran una menor expresión génica del receptor en todos los grupos menos en el salino tras 15 días de extinción.

De todos los parámetros estudiados, tanto a nivel central como periférico, solo encontramos diferencias en función del tratamiento en la expresión génica del GPR55 en el PFC de ratas Fischer 344 tras 15 días de extinción, de la MAGL en el NAcc de ratas Fischer de extinción 0 y en el índice indirecto de producción de 2-AG (DAGL/MAGL) en muestras de bazo ratas de ambas razas tras 15 días de extinción, y, salvo en el último caso, las diferencias no se dan en los grupos de distintos tiempos de

extinción porque varía la expresión génica de la molécula estudiada en los controles salinos, lo que dificulta su explicación.

En el caso de la expresión génica de MAGL en el NAcc, teniendo en cuenta que no hay diferencias basales entre las dos razas de rata en estudio, la menor expresión de esta enzima en el grupo Fischer 344 salino podría deberse a que el procedimiento de autoadministración afectase diferencialmente a las ratas de esta raza y que este efecto se anulase por la influencia de la autoadministración de morfina. Si observamos la gráfica, podemos ver cómo este efecto desaparece 7 días más tarde, manteniéndose los niveles de expresión génica de la enzima en el grupo Fischer 344 salino tras los 15 días de extinción. En los grupos Fischer 344 morfina, la influencia del opioide sobre la expresión génica de MAGL se mantendría tras 7 días de extinción, pero disminuiría 15 días después de sustituir la droga por suero salino, aunque la diferencia con su control no sea suficiente para resultar estadísticamente significativa.

No es extraño encontrar efectos que solo se manifiesten tras 15 días de extinción (Sánchez-Cardoso et al., 2009) y esto es lo que parece que ocurre en los otros dos casos en los que encontramos diferencias en función del tratamiento. En el caso del análisis de las muestras de bazo, puede ser que la sustitución de la morfina por suero salino provoque una disminución en los niveles de 2-AG, como respuesta de estrés, que solo puede apreciarse tras 15 días. La propia retirada de morfina puede ser considerada como una respuesta de estrés en sí misma donde se modula la actividad conductual, neural y endocrina (Houshyar et al., 2001), generalmente aumentando los niveles de glucocorticoides en sangre y causando disfunción del sistema inmune (Yang y Glaser, 2002). La disminución en los niveles estimados de 2-AG en los grupos que se autoadministraron morfina podría deberse a un efecto compensatorio, ya que la retirada de morfina ha demostrado tener un fuerte efecto inmunosupresor (Roy et al., 2011) y el 2-AG parece tener marcados efectos bifásicos, siendo inmunosupresor a dosis elevadas y activando la respuesta inmune a dosis bajas (Croxford y Yakamura, 2005). También podríamos considerar un efecto directo de sustituir la morfina por suero salino, aunque en este caso solo afectase a las ratas de la raza Fischer 344, las diferencias encontradas en la expresión génica del GPR55 en el PFC. En todos los grupos de la raza Lewis y en los grupos salino de la raza Fischer 344, la expresión génica de este receptor disminuye con el paso del tiempo, mientras que en los grupos Fischer 344 que se autoadministraron morfina, aumenta al sustituir la droga por suero salino y este efecto permanece tras 15 días de extinción. La evidencia de la capacidad del sistema endocannabinoide para modular la

transmisión noradrenérgica (Oropeza et al., 2007), un sistema de neurotransmisión estrechamente implicado en las conductas de extinción, y el efecto facilitador de la neurotransmisión que produce la activación del GPR55 (Oka et al., 2007; Pietr et al., 2009; Henstridge et al., 2010; Piñeiro et al., 2011), contrapuesto al que produce la activación del CB1, podría ayudar a explicar el distinto patrón de extinción de la conducta de autoadministración de opioides que muestran las dos razas de rata de nuestros estudios.

En los estudios realizados sobre el sistema endocannabinoide tras la administración pasiva de morfina, encontrar diferencias o no, o la dirección que muestren estas diferencias depende en gran medida de la especie estudiada, la raza concreta y el protocolo utilizado (Rubino et al., 1997; Vigano et al., 2005). A pesar de esta realidad, dada la amplia evidencia de interacciones funcionales entre el sistema opioide endógeno y el endocannabinoide (Hine et al., 1975; Deikel et al., 1976; Vela et al., 1995; Yamaguchi 2001; Del Arco et al., 2002) sorprende no encontrar más diferencias en función del tratamiento.

En el estudio a través de microdiálisis sobre alteraciones en los niveles de endocannabinoides por autoadministración de heroína realizado por el grupo de Parsons en 2007, encuentran una elevación de los niveles de AEA y un leve, pero significativo descenso en los niveles de 2-AG en el NAcc Shell (Caillé et al., 2007). Estas diferencias se deben a reacciones agudas al opioide, ya que la microdiálisis se realizó durante la sesión de autoadministración, y podrían no permanecer como neuroadaptaciones en respuesta a una exposición crónica, como es el caso de nuestro estudio. Caillé y colaboradores argumentan que esta respuesta de elevación de AEA, unida al descenso en la autoadministración de heroína que provoca la administración de antagonistas cannabinoides (observado en otro experimento del mismo estudio), muestran cómo los endocannabinoides participan en las características motivacionales de los opioides. Esto podría ayudar a explicar, al menos en parte, la menor propensión de las ratas Fischer 344 a autoadministrarse opioides, ya que las ratas de esta cepa, muestran consistentemente un mayor nivel de producción neta de AEA. En otro estudio que analiza la influencia de la autoadministración de heroína sobre los receptores de cannabinoides, Liana Fattore relata cómo tras la autoadministración del opioide, los cerebros de las ratas Lister Hooded mostraron un aumento de la densidad de receptores CB1 en la amígdala y en el ATV en el experimento de autorradiografía cuantitativa, y un aumento de la funcionalidad de dicho receptor en el núcleo acumbens medido por autorradiografía funcional (Fattore et al., 2007). Además de justificar las diferencias entre estos resultados y los de nuestro estudio alegando la

distinta sustancia opioide autoadministrada (nosotros morfina, Fattore heroína), las distintas técnicas utilizadas (PCR frente a autorradiografía) y las distintas cepas de rata utilizadas como sujetos experimentales (Lewis y Fischer 344 frente a Lister Hooded) consideramos que con el conocimiento actual caben dos objeciones a las conclusiones comentadas de este estudio: Una que al utilizar el agonista cannabinoide CP-55,940 en sus estudios de autorradiografía no se puede asegurar que estén midiendo solo el receptor CB1, pues además de unirse a este receptor, se une como agonista al CB2 (aunque su expresión en SNC es pequeña comparada a la del CB1) y como antagonista al receptor GPR55 (Kapur et al., 2009), y otra que utilizan como grupo control los animales que fallaron en adquirir la autoadministración de heroína, lo que visto nuestros resultados, podría hacer que pasasen como cambios inducidos por la autoadministración del opioide diferencias basales relacionadas con su vulnerabilidad a adquirir la conducta de autoadministración de heroína.

Respecto a los resultados obtenidos en muestras de bazo, encontramos analizando por separado solo los animales que se sacrificaron tras 15 días de extinción, la única diferencia clara en función del tratamiento, que, aunque se da en la misma dirección en las ratas de ambas cepas, puede reflejar adaptaciones del sistema endocannabinoide inducidas por la autoadministración de morfina: Los animales de ambas cepas de rata que se autoadministraron morfina, muestran un descenso en el índice indirecto de producción de 2-AG (DAGL/MAGL) comparados con sus controles salinos tras 15 días de extinción. La literatura describe la capacidad de este endocannabinoide, el 2-AG, para modular la proliferación de esplenocitos (Lee et al., 1995) y no resulta descabellado que la relación entre la expresión génica de las enzimas encargadas de su síntesis y degradación se altere tras haberse adaptado a la alostasis inducida por la autoadministración de morfina durante 19 días y la nueva variación del punto de homeostasis al sustituir la droga por suero salino 15 días antes de extraer las muestras. Las demás diferencias encontradas son, como en el caso de las áreas del SNC estudiadas, en función de la raza, mostrando que las ratas Fischer 344 muestran más expresión génica de las enzimas relacionadas con el 2-AG (DAGL y MAGL) y que al darse en la enzima de síntesis tanto como en la de degradación hace que no se muestren diferencias entre las razas en el índice indirecto de producción de este endocannabinoide, una menor expresión génica de FAAH respecto a las Lewis que al mostrar una expresión génica similar de NAPE-PLD se traduce en un índice indirecto de producción neta de AEA elevado, y una expresión menor del ARNm que codifica el principal receptor cannabinoide del sistema inmune: el CB2. Estas diferencias parecen ser constitutivas ya que no varían en función del tratamiento

ni a lo largo del tiempo de extinción y sin duda contribuirán a explicar las diferencias mostradas en ambas razas de rata en la competencia de sus sistemas inmunes que les hacen ser un buen modelo para estudiar el rechazo de órganos transplantados (Adams et al., 1993). La falta de reflejo de las interacciones entre los sistemas opioide endógeno y endocannabinoide en variaciones en la expresión génica de receptores cannabinoides en muestras de bazo, concuerda con lo encontrado mediante técnicas autorradiográficas estudiando ratas tolerantes a morfina (Massi et al., 2003) en donde los autores sugieren que las interacciones entre ambos sistemas deben darse a nivel post-receptor.

El hecho inesperado de no encontrar diferencias entre los animales que se autoadministraron morfina y sus controles salinos, sobre todo los sacrificados tras 19 días de autoadministración, y que además los datos de los controles salinos varían con el tiempo de extinción parece indicar que el procedimiento de autoadministración intravenosa en sí mismo tiene efectos sobre el sistema endocannabinoide. En esta misma dirección parecen apuntar los resultados obtenidos al estudiar la influencia que sobre este sistema ejerce la autoadministración de cocaína que analizamos en estudios anteriores en nuestro laboratorio (Rivera et al., 2013) en donde las mayores diferencias se dan, casi en la totalidad de las estructuras estudiadas, entre los controles salinos y los controles de estabulario. Esta influencia del procedimiento sobre los parámetros estudiados puede estar ocultando datos que corroboren las interacciones buscadas.

A pesar de no haber encontrado evidencia en nuestro estudio de variaciones en el sistema endocannabinoide producidas por la autoadministración de morfina, la evidencia de interacciones funcionales opioides-cannabinoides es aplastante. Puede que como argumenta Massi estas interacciones se den en puntos comunes entre ambos sistemas corriente abajo (Massi et al., 2013), aunque teniendo en cuenta la amplia expresión del sistema endocannabinoide respecto al opioide endógeno, puede que estas interacciones estén oscurecidas por aquellas poblaciones celulares que compartiendo área, expresen moléculas del sistema endocannabinoide y no del opioide endógeno. Probablemente una estrategia fructífera sería investigar en estas áreas la formación de heterodímeros  $\mu$ -CB1 y las relaciones funcionales entre sus componentes, como sugirió el grupo de Devi al proponer la existencia de sistemas heterodiméricos cannabinoides-opioides que interactúan físicamente para integrar vías de señalización independientes (Rios et al., 2006) y cuya existencia y funcionalidad confirmaron los estudios de Hojo (Hojo et al., 2008).



## 7. CONCLUSIONES

---

1. Existen diferencias basales entre las ratas Lewis y Fischer 344 en los niveles de unión a  $^3\text{H-CP 55,940}$  en el núcleo lateral del globo pálido. En concreto, las ratas F344 muestran niveles de unión superiores.
2. Se observan diferencias basales en la expresión de diferentes genes del sistema endocannabinoide. En concreto, niveles de expresión génica del receptor CB1 en PFC, de MAGL en Nacc y de FAAH en PFC y NAcc menores en las ratas F344. También hay evidencia de mayores niveles de anandamida en las ratas F344 tanto en PFC como en NAcc tal y como se desprende del ratio NAPE-PLD/FAAH incrementado en las ratas F344.
3. No conseguimos que machos de las cepas de rata Lewis y Fischer 344 adquirieran de manera estable la conducta de autoadministración del agonista cannabinoide WIN 55,512-2. No obstante, ambas razas presionaron más la palanca activa que la inactiva, y en la primera sesión de extinción aumentaron el número de presiones sobre la palanca activa al sustituirse el agonista por el vehículo, siendo ambos hechos indicativos de cualidades reforzantes. No se dieron diferencias entre razas en la adquisición ni en el mantenimiento de la autoadministración. La administración del antagonista CB1 AM 251 provocó una disminución del número de presiones de palanca activa sólo en las ratas F344.
4. Las ratas LEW adquirieron más rápidamente una conducta estable de autoadministración de morfina y extinguieron dicha conducta también más rápidamente que las ratas F344.
5. No se han observado efectos consistentes de la autoadministración de morfina o la extinción de esta conducta sobre la expresión génica de los elementos del sistema endocannabinoide estudiados a través de PCR en tiempo real en PFC y Nacc de ratas LEW y F344.
6. A nivel del bazo, se reproducen las diferencias en la expresión génica de FAAH y en el índice indirecto de niveles de AEA encontradas en cerebro. Es decir se observa una menor expresión génica en las F344 de la enzima y un mayor ratio NAPE-PLD/FAAH que en las LEW. Con respecto a los niveles de DAGL y MAGL, las ratas F344 mostraron mayores niveles de expresión génica de estas enzimas que las LEW. También observamos niveles superiores de expresión del receptor CB2 en las LEW mientras que no encontramos diferencias entre las razas de rata en cuanto a la expresión del receptor GPR55. Por último, tras 15

días de extinción de la autoadministración de morfina observamos una disminución en el índice indirecto del nivel de 2-AG en ambas cepas respecto a sus controles salinos.

## Referencias

- Abbadie C, Rossi GC, Orciuolo A et al. Anatomical and functional correlation of the endomorphins with mu opioid receptor splice variants. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1075-1082.
- Adams DH, Russell ME, Hancock WW, Sayegh MH, Wyner LR, Karnovsky MJ. Chronic rejection in experimental cardiac transplantation: studies in the Lewis-F344 model. *Immunol Rev.* 1993 Aug; 134:5-19.
- Agudelo, M., Newton, C., Widen, R., Sherwood, T., Nong, L., Friedman, H., Klein, T.W., 2008. Cannabinoid receptor 2 (CB2) mediates immunoglobulin class switching from IgM to IgE in cultures of murine-purified B lymphocytes *J. Neuroimmune Pharmacol.* 3, 35–42.
- Ahluwalia, J., Urban, L., Capogna, M., Bevan, S., Nagy, I., 2000. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience.* 100, 685-8.
- Akinshola, B.E., Chakrabarti, A., Onaivi, E.S., 1999. In-vitro and in-vivo action of cannabinoids. *Neurochem Res.* 24, 1233-40.
- Allouche, S., Polastron, J., Hasbi, A., Homburger, V., and Jauzac, P. (1999a). Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochem. J.* 342 (Pt1), 71–78. doi: 10.1042/0264-6021:3420071.
- Allouche S, Noble F, Marie N. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front Pharmacol.* 2014 Dec 18; 5:280. doi: 10.3389/fphar. 2014. 00280. eCollection 2014. Review.
- Ambrosio, E., Goldberg, S.R., Elmer, G.I., 1995. Behavior genetic investigation of the relationship between spontaneous locomotor activity and the acquisition of morphine self-administration behavior. *Behav Pharmacol.* 6, 229-237.
- Anton B, Martinez I, Calva JC et al. Immunohistochemistry for Endomorphins in the rat CNS. *Neurosci Abstr* 1998; 24[1], 851.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. 2006. *In silico* patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:1–4.
- Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, Platzer W, Schroder R, Blattermann S, Kostenis E, Brown AJ, Heinemann A, Waldhoer M 5 April 2011 GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res* 10.1038/cr.2011.60
- Barbara G, Alloui A, Nargeot J, et al. T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids. *J Neurosci* 2009;29: 13106–14.
- Barta WD, Kurth ME, Stein MD, Tennen H, Kiene SM (2009) Craving and self-efficacy in the first five weeks of methadone maintenance therapy: a daily process study. *J Stud Alcohol Drugs* 70:735–740.

Basavarajappa, B.S., 2007. Neuropharmacology of the Endocannabinoid Signaling System-Molecular Mechanisms, Biological Actions and Synaptic Plasticity. *Curr Neuropharmacol.* 5, 81-97.

Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 2012; 6:9.

Beitner-Johnson, D., Guitart, X., Nestler, E.J., 1991. Dopaminergic brain reward regions of Lewis and Fischer rats display different levels of tyrosine hydroxylase and other morphine- and cocaine-regulated phosphoproteins. *Brain Res.* 561, 147-50.

Bell, S.M., Macenski, M.J., Silverman, P.B., Meisch, R.A., 1993. Water deprivation-induced oral self-administration of cocaine in the Lewis rat: evidence for locomotor effects but not reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav.* 45, 749-54.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277: 1094–7.

Berthele A, Platzer S, Dworzak D, Schadrack J, Mahal B, Buttner A et al. (2003). [3 H]-nociceptin ligand-binding and nociceptin opioid receptor mRNA expression in the human brain. *Neuroscience* 121: 629–640.

Besse, D., Lombard, M. C., Zajac, J. M., Roques, B. P., and Besson, J. M. (1990). Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 521, 15–22. doi: 10.1016/0006 - 8993 (90) 91519-M.

Bian, J. M., Wu, N., Su, R. B., and Li, J. (2012). Opioid receptor trafficking and signaling: what happens after opioid receptor activation? *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 167–184. doi: 10.1007/s10571-011-9755-5.

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.

Bisogno T, Melck D, Bobrov M, et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB (1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* 2000; 351(Pt 3):817–24.

Bisogno T (2008). Endogenous cannabinoids: Structure and metabolism. *J Neuroendocrinol*; 20:1-9.

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 2007; 14:1347–56.

Bodnar, R. J. (2014). Endogenous opiates and behavior: 2013. *Peptides* 62C, 67–136. doi: 10.1016/j. peptides. 2014. 09. 013.

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, 884-8.

Bossong, M.G., van Berckel, B.N., Boellaard, R., Zuurman, L., Schuit, R.C., Windhorst, A.D., van Gerven, J.M., Ramsey, N.F., Lammertsma, A.A., Kahn, R.S., 2008. Delta9-Tetrahydrocannabinol Induces Dopamine Release in the Human Striatum. *Neuropsychopharmacology*.

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.

Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 2001; 60:155–63.

Brodkin, E.S., Carlezon, W.A., Jr., Haile, C.N., Kosten, T.A., Heninger, G.R., Nestler, E.J., 1998. Genetic analysis of behavioral, neuroendocrine, and biochemical parameters in inbred rodents: initial studies in Lewis and Fischer 344 rats and in A/J and C57BL/6J mice. *Brain Res*. 805, 55-68.

Brown AJ, Wise A 2001 GlaxoSmithKline. Identification of modulators of GPR55 activity 2001. Patent WO/2001/86305.

Brown, A.J., 2007. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 152, 567-75.

Brown AJ, Daniels DA, Kassim M, Brown S, Haslam CP, Terrell VR, Brown J, Nichols PL, Staton PC, Wise A, Dowell SJ 2011 Pharmacology of GPR55 in yeast and identification of GSK494581A as a mixed-activity glycine transporter subtype 1inhibitor and GPR55 agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 337:236 – 246.

Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., & Onaivi, E. S. (2008). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*, 62(12), 944–949. <http://doi.org/10.1002/syn.20569>

Burstein SH, Huang SM, Petros TJ, Rossetti RG, Walker JM, Zurier RB. Regulation of anandamide tissue levels by N-arachidonylglycine. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1147–50.

Burstein SH, McQuain CA, Ross AH, Salmonsens RA, Zurier RE. Resolution of inflammation by N-arachidonoylglycine. *J Cell Biochem* 2011; 112: 3227–33.

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, 207-14.

Cabral, G.A., Raborn, E.S., Griffin, L., Dennis, J., Marciano-Cabral, F., 2008. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br. J. Pharmacol*. 153, 240–251.

Cadet P., Mantione K.J., Stefano G.B., 2003. Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J. Immunol*. 170: 5118–5123.

Cadoni, C., & Di Chiara, G. (2007). Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *Journal of Neurochemistry*, 103(2), 487–499.

- Cadoni C, Simola N, Espa E, Fenu S, Di Chiara G., 2015. Strain dependence of adolescent Cannabis influence on heroin reward and mesolimbic dopamine transmission in adult Lewis and Fischer 344 rats. *Addict Biol.* 2015 Jan; 20(1):132-42. Doi: 10.1111/adb.12085.
- Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394, 277–281.
- Calo' G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D (2000). Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br J Pharmacol* 129: 1261–1283.
- Camp, D.M., Browman, K.E., Robinson, T.E., 1994. The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain Res.* 668, 180-93.
- 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, 13-6.
- Carlisle, S.J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., Cabral, G.A., 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.* 2, 69–82.
- Carvalho AF, Mackie K, Van Bockstaele EJ (2010a) Cannabinoid modulation of limbic forebrain noradrenergic circuitry. *Eur J Neurosci* 31:286–301.
- Carvalho AF, Reyes AR, Sterling RC, Unterwald E, Van Bockstaele EJ (2010b) Contribution of limbic norepinephrine to cannabinoid-induced aversion. *Psychopharmacology* 211:479–491.
- Chaouloff, F., Kulikov, A., Sarrieau, A., Castanon, N., Mormede, P., 1995. Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationship with the hippocampal serotonergic system. *Brain Res.* 693, 169-78.
- Cheng PY, Liu-Chen LY, Chen C, Pickel VM (1996) Immunolabeling of Mu opioid receptors in the rat nucleus of the solitary tract: extrasynaptic plasmalemmal localization and association with Leu5-enkephalin. *J Comp Neurol* 371:522–536.
- Childers, S.R., Pacheco, M.A., Bennett, B.A., Edwards, T.A., Hampson, R.E., Mu, J., Deadwyler, S.A., 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, 1-9.
- Christensen, C. J., Kohut, S. J., Handler, S., Silberberg, A., & Riley, A. L. (2009). Demand for food and cocaine in Fischer and Lewis rats. *Behavioral Neuroscience*, 123(1), 165–71. <http://doi.org/10.1037/a0013736>
- 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, 1281-91.

- Civelli O (2008). The orphanin FQ/nociceptin (OFQ/N) system. *Results Probl Cell Differ* 46: 1–25.
- Cichewicz DL, Martin ZL, Smith FL, Welch SP (1999) Enhancement mu opioid antinociception by oral delta9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J Pharmacol Exp Ther* 289:859–867.
- Cichewicz DL, McCarthy EA (2003). Antinociceptive synergy between delta (9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1010–1015.
- Cichewicz DL (2004) Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci* 74:1317–1324.
- Cohen, H., Zohar, J., Gidron, Y., Matar, M. A., Belkind, D., Loewenthal, U., ... Kaplan, Z. (2006). Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1208–18. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.12.003>
- Contassot E, Tenan M, Schnuriger V, Pelte MF, Dietrich PY. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecol Oncol* 2004; 93:182–8.
- Corboz MR, Rivelli MA, Egan RW, Tulshian D, Matasi J, Fawzi AB *et al.* (2000). Nociceptin inhibits capsaicin-induced bronchoconstriction in isolated guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* 402: 171–179.
- Corboz MR, Fernandez X, Egan RW, Hey JA (2001). Inhibitory activity of nociceptin/orphanin FQ on capsaicin-induced bronchoconstriction in the guinea-pig. *Life Sci* 69: 1203–1211.
- Corchero J, Avila MA, Fuentes JA, Manzanares J (1997a) Delta-9-tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci* 61: PL 39–43.
- Corchero J, Fuentes JA, Manzanares J. delta 9-Tetrahydrocannabinol increases proopioidmelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol.* 1997b; 323:193–195.
- Corchero J, Romero J, Berrendero F, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA, Fuentes JA, Manzanares J (1999) Time-dependent differences of repeated administration with delta9-tetrahydrocannabinol in proenkephalin and cannabinoid receptor gene expression and G-protein activation by mu-opioid and CB1-cannabinoid receptors in the caudate-putamen. *Brain Res Mol Brain Res* 67:148–157.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA (2004a) Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 16:159–172.
- Coria, S. M., Roura-martínez, D., Ucha, M., Assis, M. A., Miguéns, M., García-Lecumberri, C., ... Ambrosio, E. (2014). Strain differences in the expression of endocannabinoid genes and in cannabinoid receptor binding in the brain of Lewis and Fischer 344 rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 53, 15–22.

Cox ML, Haller VL, Welch SP (2007) Synergy between delta9-tetrahydrocannabinol and morphine in the arthritic rat. *Eur J Pharmacol* 567:125–130.

Cravatt BF, Prosperogarcia O, Siuzdak G, et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 1995; 268:1506–9.

Croxford, J.L., Yamamura, T., 2005. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J. Neuroimmunol.* 166, 3–18.

Daaka, Y., Klein, T.W., Friedman, H., 1995. Expression of cannabinoid receptor mRNA in murine and human leukocytes. *Adv Exp Med Biol.* 373, 91-6.

Dalle Carbonare M, Del Giudice E, Stecca A, Colavito D, Fabris M, D'Arrido A y cols (2008). A saturated N-acylethanolamine other than N-palmitoyl ethanolamine with anti-inflammatory properties: a neglected story. *J Neuroendocrinol*; 20 Suppl 1:26-34.

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, 673-8.

Danise E, Oddi S, Bari M y Maccarrone M (2007). Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr Med Chem*; 14:2702-15.

Davis, C. M., Roma, P. G., Dominguez, J. M., & Riley, A. L. (2007). Morphine-induced place conditioning in Fischer and Lewis rats: acquisition and dose-response in a fully biased procedure. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 86(3), 516–23.

Del Arco I, Navarro M, Bilbao A, Ferrer B, Piomelli D, Rodríguez De Fonseca F. Attenuation of spontaneous opiate withdrawal in mice by the anandamide transport inhibitor AM404. *Eur J Pharmacol* 2002; 454(1):103-4.

Deikel SM, Carder B. Attenuation of precipitated abstinence in methadone-dependent rats by delta9-THC. *Psychopharmacol Commun* 1976; 2(1):61-5.

Den Boon, F. S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., Werkman, T. R. (2012). Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), 3534–3539.

De Filippis, D., D'Amico, A., Iuvone, T., 2008. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: new perspective in chronic inflammation. *J. Neuroendocrinol.* 20 (Suppl. 1), 20–25.

De Luca MA, Valentini V, Bimpisidis Z, Cacciapaglia F, Caboni P, Di Chiara G. Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Self-Administration by Sprague-Dawley Rats and Stimulation of in vivo Dopamine Transmission in the Nucleus Accumbens Shell. *Front Psychiatry.* 2014 Oct 17;5: 140. doi: 10.3389/fpsy.2014.00140.

De Vries TJ, Homberg JR, Binnekade R, Raaso H, Schoffelmeer AN (2003) Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology* 168:164–169.

Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549–563.

Den Boon FS, Chameau P, Schaafsma-Zhao Q, van Aken W, Bari M, Oddi S, Kruse CG, Maccarrone M, Wadman WJ, Werkman TR., 2012. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 28; 109 (9):3534-9. doi: 10.1073/pnas.1118167109. Epub 2012 Feb 13.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. 2004; 305:1014-7.

Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM, et al. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J Biol Chem* 2001; 276:6967-73.

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, 605-13.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258, 1946-9.

Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghbir, R., Reisine, T., Bradley, P. B., Portoghese, P. S., et al. (1996). International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* 48, 567-592.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:346-9.

Di Marzo V y Petrosino S (2007). Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*; 18:129-40.

Ding YQ, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N (1996) Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 367:375-402.

Doyle GA, Rebecca, Sheng X, Lin SS, Press DM, Grice DE, Buono RJ, Ferraro TN, Berrettini WH. Identification of three mouse mu-opioid receptor (MOR) gene (Oprm1) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene*. 2007; 388:135-147.

Du, H., Chen, X., Zhang, J., and Chen, C. Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR-gamma. *Br J Pharmacol* (2011).

Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, Gupta A, Hansen HS, Hansen SH, Devi LA, Hurd YL (2008) Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:826-834.

Facci, L., Dal Toso, R., Romanello, S., Buriani, A., Skaper, S.D., Leon, A., 1995. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 3376-3380.

Fattore L, Spano S, Cossu G, Deiana S, Fadda P, Fratta W (2005b) Cannabinoid CB(1) antagonist SR 141716A attenuates reinstatement of heroin self-administration in heroin-abstinent rats. *Neuropharmacology* 48:1097–1104.

Fattore L, Vigano D, Fadda P, Rubino T, Fratta W, Parolaro D (2007b) Bidirectional regulation of mu-opioid and CB1-cannabinoid receptor in rats self-administering heroin or WIN 55,212-2. *Eur J Neurosci* 25:2191–2200.

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 U S A.* 90, 7656-60.

Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48, 443-50.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J y cols (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*; 393:231-5.

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, 257-67.

Fernandez-Ruiz, J., Gonzales, S., 2005. Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol.* 479-507.

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, 23-34.

Fischer-Stenger, K., Updegrave, A.W., Cabral, G.A., 1992. Delta 9-tetrahydrocannabinol decreases cytotoxic T lymphocyte activity to herpes simplex virus type 1-infected cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 422–430.

Flores, G., Wood, G.K., Barbeau, D., Quirion, R., Srivastava, L.K., 1998. Lewis and Fischer rats: a comparison of dopamine transporter and receptors levels. *Brain Res.* 814, 34-40.

Florin S, Suaudeau C, Meunier JC, Costentin J (1996). Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* 317: 9–13.

Fole, A., González-Martín, C., Huarte, C., Alguacil, L. F., Ambrosio, E., & Del Olmo, N. (2011). Effects of chronic cocaine administration on spatial learning and hippocampal spine density in two genetically different strains of rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 491–7.

Fole, A., Martin, M., Morales, L., & Del Olmo, N. (2015). Effects of chronic cocaine treatment during adolescence in Lewis and Fischer-344 rats: Novel location recognition impairment and changes in synaptic plasticity in adulthood. *Neurobiology of Learning and Memory*, 123, 179–86.

Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and metabolizing enzymes during rat fetoplacental development: a role in uterine remodelling. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42:1884–92.

Foynes, M. M., & Riley, A. L. (2004). Lithium-chloride-induced conditioned taste aversions in the Lewis and Fischer 344 rat strains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 79(2), 303–8.

Fu J, Bottegoni G, Sasso O, et al. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 2012; 15:64–9.

Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61.

Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society.* 86, 1646-1647.

Gardner, E.L., 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 81, 263-84.

Gaveriaux-Ruff, C., and Kieffer, B. L. (2002). Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* 36, 62–71. doi: 10.1054/npep.2002.0900.

George, F.R., Goldberg, S.R., 1989. Genetic approaches to the analysis of addiction processes. *Trends Pharmacol Sci.* 10, 78-83.

George, F.R., Porrino, L.J., Ritz, M.C., Goldberg, S.R., 1991. Inbred rat strain comparisons indicate different sites of action for cocaine and amphetamine locomotor stimulant effects. *Psychopharmacology (Berl).* 104, 457-62.

Georgoussi Z., Merkouris M., Mullaney I., Megaritis G., Carr C., Zioudrou C., et al. (1997). Selective interactions of mu-opioid receptors with pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail incoupling. *Biochim. Biophys. Acta* 1359, 263–274. Doi: 10.1016/S0167-4889(97)00097-9.

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), 129-34.

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, 5327-33.

Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4269–74.

Glowa, J. R., Shaw, A. E., & Riley, A. L. (1994). Cocaine-induced conditioned taste aversions: comparisons between effects in LEW/N and F344/N rat strains. *Psychopharmacology*, 114(2), 229–232.

Goldberg IE, Rossi GC, Letchworth SR et al. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:1007-1013.

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, 369-73.

Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R., 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071, 10-23.

Gonzalez, S., Manzanares, J., Berrendero, F., Wenger, T., Corchero, J., Bisogno, T., Romero, J., Fuentes, J.A., Di Marzo, V., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J., 1999. Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB (1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology.* 70, 137-45.

Grazia Cascio M, Minassi A, Ligresti A, Appendino G, Burstein S, Di Marzo V. A structure-activity relationship study on N-arachidonoyl-amino acids as possible endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314:192–6.

Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI *et al.* (2012). Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485: 400–404.

Grigson, P.S., Freet, C.S., 2000. The suppressive effects of sucrose and cocaine, but not lithium chloride, are greater in Lewis than in Fischer rats: evidence for the reward comparison hypothesis. *Behav Neurosci.* 114, 353-63.

Guitart, X., Beitner-Johnson, D., Marby, D.W., Kosten, T.A., Nestler, E.J., 1992. Fischer and Lewis rat strains differ in basal levels of neurofilament proteins and their regulation by chronic morphine in the mesolimbic dopamine system. *Synapse.* 12, 242-53.

Guitart, X., Lumeng, L., Li, T.K., Nestler, E.J., 1993. Alcohol-preferring and nonpreferring rats display different levels of neurofilament proteins in the ventral tegmental area. *Alcohol Clin Exp Res.* 17, 580-5.

Gupta A, Mulder J, Gomes I, Rozenfeld R, Bushlin I, Ong E, Lim M, Maillet E, Junek M, Cahill CM, Harkany T, Devi LA (2010) Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal* 3: ra 54.

Hackler L, Zadina JE, Ge LJ et al. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* 1997; 18:1635-1639.

Haile, C.N., Carey, G., Varty, G.B., Coffin, V.L., 2000. The dopamine D (1) receptor agonist SKF-82958 serves as a discriminative stimulus in the rat. *Eur J Pharmacol.* 388, 125-31.

Hajos, N., Ledent, C., Freund, T.F., 2001. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience.* 106, 1-4.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, et al. 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:3662–5.

Harris, L.S., Carchman, R.A., Martin, B.R., 1978. Evidence for the existence of specific cannabinoid binding sites. *Life Sci.* 22, 1131-7.

Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and NFAT activation. *FASEB J* 2009; 23:183–93.

Henstridge CM, Balenga NA, Schroder R, Kargl JK, Platzner W, Martini L, et al. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 2010; 160:604–614.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 1932-6.

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, 563-83.

Herradón, G., Morales, L., & Alguacil, L. (2003). Differences of  $\mu$ -opioid receptors between Lewis and F344 rats. *Life Sciences*, 73(12), 1537–1542.

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, 294-307.

Hiley, C.R., Kaup, S.S., 2007. GPR55 and the vascular receptors for cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 152, 559-61.

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, 579-88.

Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB. Accumulation of Narachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997;69:631–8.

Hine B, Torrelío M, Gershon S. Attenuation of precipitated abstinence in methadone-dependent rats by delta 9-THC. *Psychopharmacol Commun* 1975;1(3):275-83.

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, 621-6.

Ho WS, Hiley CR. Vasorelaxant activities of the putative endocannabinoid virodhamine in rat isolated small mesenteric artery. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56:869–75.

Hohmann, A.G., Briley, E.M., Herkenham, M., 1999. Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res.* 822, 17-25.

- Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y (2008) Mu-opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci* 108:308–319.
- Horan, B., Smith, M., Gardner, E.L., Lepore, M., Ashby, C.R., Jr., 1997. (-)-Nicotine produces conditioned place preference in Lewis, but not Fischer 344 rats. *Synapse*. 26, 93-4.
- 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, 504-10.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161–202.
- Huang SM, Bisogno T, Petros TJ, et al. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J Biol Chem* 2001; 276:42639–44.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8400–5.
- Hunter, S.A., Burstein, S.H., 1997. Receptor mediation in cannabinoid stimulated arachidonic acid mobilization and anandamide synthesis. *Life Sci*. 60, 1563-73.
- Irving, A.J., Coutts, A.A., Harvey, J., Rae, M.G., Mackie, K., Bewick, G.S., Pertwee, R.G., 2000. Functional expression of cell surface cannabinoid CB (1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 98, 253-62.
- 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, 2023-8.
- 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, 134-41.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr et al. (1997). Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14854–14858.
- Jeong HJ, Vandenberg RJ, Vaughan CW. N-arachidonyl-glycine modulates synaptic transmission in superficial dorsal horn. *Br J Pharmacol* 2010; 161:925–35.
- Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T y Ueda N (2007). Discovery and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*; 282:3614-23.

Johns, D.G., Behm, D.J., Walker, D.J., Ao, Z., Shapland, E.M., Daniels, D.A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P.C., Green, P., Shabon, U., Bao, W., Aiyar, N., Yue, T.L., Brown, A.J., Morrison, A.D., Douglas, S.A., 2007. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol.* 152, 825-31.

Jorda, M.A., Verbakel, S.E., Valk, P.J., Vankan-Berkhoudt, Y.V., Maccarrone, M., Finazzi-Agro, A., Lowenberg, B., Delwel, R., 2002. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood* 99, 2786–2793.

Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG. Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem* 2006; 281:9066–75.

Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:6375–80.

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, 736-42.

Kaminski, N.E., 1998. Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol.* 83, 124-32.

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, 1077-85.

Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, et al. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem* 2009; 284:29817–27.

Kapusta DR, Sezen SF, Chang JK, Lipton H, Kenigs VA (1997). Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci* 60: L15–L21.

Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 67:1697–1704.

Kenakin, T. (2011). Functional selectivity and biased receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 296–302. doi: 10.1124/jpet. 110.173948.

Kieffer, B. L. (1999). Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 19– 26. doi:10. 1016/S0165- 6147 (98) 01279- 6.

King, H. E., Wetzell, B., Rice, K. C., & Riley, A. L. (2014). 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV)-induced conditioned taste avoidance in the F344/N and LEW rat strains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 126, 163–9.

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, 6461-6.

Klein, T.W., Cabral, G.A., 2006. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 50–64.

Klukovits A, Tekes K, Gunduz CO, Benyhe S, Borsodi A, Deak BH *et al.* (2010). Nociceptin inhibits uterine contractions in term-pregnant rats by signaling through multiple pathways. *Biol Reprod* 83: 36–41.

Kosten, T.A., Miserendino, M.J., Chi, S., Nestler, E.J., 1994. Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. *J Pharmacol Exp Ther.* 269, 137-44.

Kosten, T.A., Miserendino, M.J., Haile, C.N., DeCaprio, J.L., Jatlow, P.I., Nestler, E.J., 1997. Acquisition and maintenance of intravenous cocaine self-administration in Lewis and Fischer inbred rat strains. *Brain Res.* 778, 418-29.

Kosten, T.A., Bombace, J.C., 2001. Ethanol enhances naloxone sensitization and disrupts morphine discrimination--comparison to dizocilpine and pentobarbital: explanation of enhancing acute and attenuating chronic effects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 25, 1283-306.

Kosten, T.A., Ambrosio, E., 2002. HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology.* 27, 35-69.

Kosten, T. A., Zhang, X. Y., & Haile, C. N. (2007). Strain differences in maintenance of cocaine self-administration and their relationship to novelty activity responses. *Behavioral Neuroscience*, 121(2), 380–8.

Kosten, T. A., & Miserendino, M. J. D. (2012). Stress alters the discriminative stimulus and response rate effects of cocaine differentially in lewis and Fischer inbred rats. *Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)*, 2(1), 23–37.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, et al. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem* 2002; 277:23278–86.

Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudanski J, Malinowska B. Virodhamine relaxes the human pulmonary artery through the endothelial cannabinoid receptor and indirectly through a COX product. *Br J Pharmacol* 2008; 155:1034–42.

Kraft, B., Wintersberger, W., Kress, H.G., 2004. Cannabinoid receptor-independent suppression of the superoxide generation of human neutrophils (PMN) by CP55 940, but not by anandamide. *Life Sci.* 75, 969–977.

Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2007. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature.* 445, 643-7.

Labar G y Michaux C (2007). Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem Biodivers*; 4:1882-902.

Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 1999; 6:757–73.

Lancellotti, D., Bayer, B.M., Glowa, J.R., Houghtling, R.A., Riley, A.L., 2001. Morphine-induced conditioned taste aversions in the LEW/N and F344/N rat strains. *Pharmacol Biochem Behav.* 68, 603-10.

Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.Y., Lu, H.C., Hille, B., Mackie, K., 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 2699-704.

Law, P. Y., Wong, Y. H., and Loh, H. H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 389–430. doi: 10.1146/annurev. pharmtox.40.1.389.

Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Bohme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M., 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science.* 283, 401-4.

Lee, M., Yang, K.H., Kaminski, N.E., 1995. Effects of putative cannabinoid receptor ligands, anandamide and 2-arachidonyl-glycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 529–536.

Leggett JD, Aspley S, Beckett SRG, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2004; 141:253–62.

Lepore, M., Liu, X., Savage, V., Matalon, D., & Gardner, E. L. (1996). Genetic differences in delta 9-tetrahydrocannabinol-induced facilitation of brain stimulation reward as measured by a rate-frequency curve-shift electrical brain stimulation paradigm in three different rat strains. *Life Sciences*, 58(25), PL365–72.

Li, T.K., Lumeng, L., 1984. Alcohol preference and voluntary alcohol intakes of inbred rat strains and the National Institutes of Health heterogeneous stock of rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 8, 485-6.

Lichtman AH, Sheikh SM, Loh HH, Martin BR (2001) Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta (9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther* 298:1007–1014.

Lindley SE, Bengoechea TG, Wong DL, Schatzberg AF. Strain differences in mesotelencephalic dopaminergic neuronal regulation between Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res* 1999; 832:152–8.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim H y cols (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacol*; 54:1-7.

Lou LG, Ma L, Pei G (1997). Nociceptin/orphanin FQ activates protein kinase C, and this effect is mediated through phospholipase C/Ca<sup>2+</sup> pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 304–308.

Luedtke, R.R., Artymyshyn, R.P., Monks, B.R., Molinoff, P.B., 1992. Comparison of the expression, transcription and genomic organization of D2 dopamine receptors in outbred and inbred strains of rat. *Brain Res.* 584, 45-54.

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, 1612-23.

Ma L, Cheng ZJ, Fan GH, Cai YC, Jiang LZ, Pei G (1997). Functional expression, activation and desensitization of opioid receptor-like receptor ORL1 in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. *FEBS Lett* 403: 91–94.

Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 31938–45.

Maccarrone M, Salvati S, Bari M, Finazzi A. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol inhibit fatty acid amide hydrolase by activating the lipoxygenase pathway of the arachidonate cascade. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278:576–83.

Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci* 2010; 35:601–8.

Mackie, K., Hille, B., 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 3825-9.

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, 6552-61.

Mackie K (2005a) Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci* 77:1667–1673.

Mackie K (2006). Mechanisms of CB1 receptor signalling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obesity*; 30:S19-S23.

Mackie K., Stella N., 2006. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 8:E298–E306.

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, 655-68.

Maingret, 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, 47-54.

Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF (1992a) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 261:669–677.

- Maldonado R, Negus S, Koob GF (1992b) Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists. *Neuropharmacology*. 31: 1231–1241.
- Maldonado R, Valverde O (2003) Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur Neuropsychopharmacol* 13:401–410.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283–305.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA (1998) Chronic administration of cannabinoids regulates proenkephalin mRNA levels in selected regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 55:126–132.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 20:287–294.
- Margas W, Sedeek K, Ruiz-Velasco V (2008). Coupling specificity of NOP opioid receptors to pertussis-toxin-sensitive G alpha proteins in adult rat stellate ganglion neurons using small interference RNA. *J Neurophysiol* 100: 1420–1432.
- Martin, B.R., Harvey, D.J., Paton, W.D., 1976c. Identification of new in vivo side-chain acid metabolites of delta1-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Pharmacol*. 28, 773-4.
- Martin, S., Manzanares, J., Corchero, J., Garcia-Lecumberri, C., Crespo, J.A., Fuentes, J.A., Ambrosio, E., 1999. Differential basal proenkephalin gene expression in dorsal striatum and nucleus accumbens, and vulnerability to morphine self-administration in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res*. 821, 350-5.
- 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, 205-13.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ et al. Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol* 1999; 405: 450-471.
- Mas-Nieto M, Pommier B, Tzavara ET, Caneparo A, Da Nascimento S, Le Fur G, Roques BP, Noble F (2001) Reduction of opioid dependence by the CB(1) antagonist SR141716A in mice: evaluation of the interest in pharmacotherapy of opioid addiction. *Br J Pharmacol* 132:1809–1816.
- Massi P, Vaccani A, Romorini S, Parolaro D (2001) Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *J Neuroimmunol* 117:116–124.
- Massi P, Vaccani A, Rubino T, Parolaro D. Cannabinoids and opioids share cAMP pathway in rat splenocytes. *J Neuroimmunol*. 2003 Dec; 145(1-2):46-54.
- Massi, P., Vaccani, A., Parolaro, D., 2006. Cannabinoids, immune system and cytokine network. *Curr. Pharm. Des.* 12, 3135–3146.

- 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, 561-4.
- Matsuda, L.A., Bonner, T.I., Lolait, S.J., 1993. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*. 327, 535-50.
- Matsuda, L.A., 1997. Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit Rev Neurobiol*. 11, 143-66.
- 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, 635-40.
- McPartland JM, Glass M, Matias I, Norris RW, Kilpatrick CW. 2007. A shifted repertoire of endocannabinoid genes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Genet Genomics* 277:555–570.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:83–90.
- Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 1998; 359:1–18.
- Megaritis G., Merkouris M., and Georgoussi Z. (2000). Functional domains of delta-and mu-opioid receptors responsible for adenylylcyclase inhibition. *Receptors Channels* 7, 199–212.
- Metzger T. G., and Ferguson D. M. (1995). On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett*. 375, 1–4. Doi: 10.1016/0014-5793(95)01185-H.
- Miguéns, M., Coria, S. M., Fole, A., Ambrosio, E., & Olmo, N. Del. (2011). Depotentiation of hippocampal long-term potentiation depends on genetic background and is modulated by cocaine self-administration. *NSC*, 187, 36–42.
- Miguéns, M., Botreau, F., Olías, O., Del Olmo, N., Coria, S. M., Higuera-Matas, A., & Ambrosio, E. (2013). Genetic differences in the modulation of accumbal glutamate and  $\gamma$ -amino butyric acid levels after cocaine-induced reinstatement. *Addiction Biology*, 18(4), 623–32.
- Miguéns, M., Kastanauskaite, A., Coria, S. M., Selvas, A., Ballesteros-Yañez, I., DeFelipe, J., & Ambrosio, E. (2015). The Effects of Cocaine Self-Administration on Dendritic Spine Density in the Rat Hippocampus Are Dependent on Genetic Background. *Cerebral Cortex*, 25(1), 56–65.
- Milligan G. Orthologue selectivity and ligand bias: translating the pharmacology of GPR35. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32:317–25.
- 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, 139-42.

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, 829-36.

Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J.D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R.M., Rothwell, N.J., 2003. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci.* 23, 6470-4.

Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., et al. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341, 33–38. Doi: 10.1016/0014-5793(94)80235-1.

Mollereau C, Mouledous L (2000). Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* 21: 907–917.

Monory K, Tzavara ET, Lexime J, et al. Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:231–5.

Morgan, D., Cook, C.D., Picker, M.J., 1999. Sensitivity to the discriminative stimulus and antinociceptive effects of mu opioids: role of strain of rat, stimulus intensity, and intrinsic efficacy at the mu opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 289, 965-75.

Moyse E, Marcel D, Leonard K, Beaudet A (1997) Electron microscopic distribution of mu opioid receptors on noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Eur J Neurosci* 9:128–139.

Mukherjee, S., Adams, M., Whiteaker, K., Daza, A., Kage, K., Cassar, S., Meyer, M., Yao, B.B., 2004. Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol.* 505, 1-9.

Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.

Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, del Arco I, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez de Fonseca F (2001) Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug selfadministration. *J Neurosci* 21:5344–5350.

Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT. Biochemical and pharmacological characterization of human  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J Lipid Res.* 2012; 53:2413–2424.

Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Akil H et al. (1999a). Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412: 563–605.

Nestler EJ (1993) Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Crit Rev Neurobiol* 7:23–39.

Nestler EJ, Alreja M, Aghajanian GK (1999) Molecular control of locus coeruleus neurotransmission. *Biol Psychiatry* 46:1131–1139.

Noble, F., Benturquia, N., Crete, D., Canestrelli, C., Mas Nieto, M., Wilson, J., & Roques, B. P. (2012). Relationship between vulnerability to reinforcing effects of morphine and activity of the endogenous cholecystokinin system in Lewis and Fischer rats. *Addiction Biology*, 17(3), 528–38.

Nylander, I., Vlaskovska, M., Terenius, L., 1995. Brain dynorphin and enkephalin systems in Fischer and Lewis rats: effects of morphine tolerance and withdrawal. *Brain Res.* 683, 25-35.

Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, et al. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:840-50.

Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, et al. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol* 2009; 16:624-32.

Oka S, Tsuchie A, Tokumura A, et al. Ether-linked analogue of 2-arachidonoylglycerol (noladin ether) was not detected in the brains of various mammalian species. *J Neurochem* 2003; 85:1374–81.

Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., & Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 928–934.

Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T. 2-Arachidonoylsn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem* 2009; 145:13–20.

Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. 2010. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem* 147:671–678

Okamoto Y, Wang J, Morishita J y Ueda T (2007). Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*; 4:1842-57.

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, 31163-70.

Oropeza VC, Page ME, Van Bockstaele EJ (2005) Systemic administration of WIN 55,212-2 increases norepinephrine release in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1046:45–54.

Oropeza VC, Mackie K, Van Bockstaele EJ (2007) Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1127:36–44.

Ortiz, J., Fitzgerald, L.W., Lane, S., Terwilliger, R., Nestler, E.J., 1996. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology*. 14, 443-52.

O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152:576–82.

Oviedo, A., Glowa, J., Herkenham, M., 1993. Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*. 616, 293-302.

Ozaita, A., Puighermanal, E., Maldonado, R., 2007. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem*. 102, 1105-14.

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, 170-83.

Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006; 58(3): 389-462.

Page ME, Oropeza VC, Van Bockstaele EJ (2008) Local administration of a cannabinoid agonist alters norepinephrine efflux in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett* 431:1–5.

Paldyova E, Bereczki E, Santha M, Wenger T, Borsodi A, Benyhe S. Noladin ether a putative endocannabinoid inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem Int* 2008; 52:321–8.

Pan Y-X, Xu JY, Xu MM, Yu R, Bolan E, Gilbert AK, Pasternak GW. Isolation and expression of three new splice variants, mMOR-1A, mMOR-1O and mMOR-1P, from mouse mu opioid receptor gene *Oprm*. Submitted. 2009a

Parmar N, Ho WS. N-arachidonoyl glycine an endogenous lipid that acts as a vasorelaxant via nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels. *Br J Pharmacol* 2010; 160:594–603.

Parolaro D, Rubino T, Vigano D, Massi P, Guidali C, Realini N (2010) Cellular mechanisms underlying the interaction between cannabinoid and opioid system. *Curr Drug Targets* 11:393–405.

Pasternak DA, Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pasternak GW, Pan YX. Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy. *J Neurochem*. 2004; 91: 881–890.

Pasternak GW (2005) Molecular biology of opioid analgesia. *J Pain Symptom Manage* 29:S2–9.

Patel S, Rademacher DJ, Hillard CJ. Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:880–8.

- 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, e300-6.
- Peluso J, LaForge KS, Matthes HW, Kreek MJ, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (1998). Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 81: 184–192.
- Peluso J, Gaveriaux-Ruff C, Matthes HW, Filliol D, Kieffer BL (2001). Orphanin FQ/nociceptin binds to functionally coupled ORL1 receptors on human immune cell lines and alters peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Brain Res Bull* 54: 655–660.
- Pertwee, R.G., 2001a. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*. 48, 859-67.
- Pertwee, R.G., 2007. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol*. 152, 984-6.
- Pertwee RG (2008). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*; 13:147-59.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB and CB. *Pharmacol Rev* 2010; 62:588–631.
- Pescatore, K. A., Glowa, J. R., & Riley, A. L. (2005). Strain differences in the acquisition of nicotine-induced conditioned taste aversion. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 82(4), 751–7.
- Philibin, S. D., Vann, R. E., Varvel, S. A., Covington, H. E., Rosecrans, J. A., James, J. R., & Robinson, S. E. (2005). Differential behavioral responses to nicotine in Lewis and Fischer-344 rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 80(1), 87–92.
- Picetti, R., Ho, A., Butelman, E. R., & Kreek, M. J. (2010). Dose preference and dose escalation in extended-access cocaine self-administration in Fischer and Lewis rats. *Psychopharmacology*, 211(3), 313–323.
- Picetti, R., Caccavo, J. A., Ho, A., & Kreek, M. J. (2012). Dose escalation and dose preference in extended-access heroin self-administration in Lewis and Fischer rats. *Psychopharmacology*, 220(1), 163–72.
- Pickel VM, Colago EE (1999) Presence of mu-opioid receptors in targets of efferent projections from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract. *Synapse* 33:141–152.
- Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodriguez JJ, MacKie K (2004) Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 127:101–112.
- Pierce TL, Wessendorf MW. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 2000; 18: 181-207.
- Pietr M, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z, Juknat A. 2009 Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett* 583:2071–2076.

Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. 2011 The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 30:142–152

Piñeiro R, Falasca M. Lysophosphatidylinositol signalling: new wine from an old bottle. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821:694–705.

Pomonis JD, Billington CJ, Levine AS (1996). Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats. *Neuroreport* 8: 369–371.

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, 1123-7.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301:1020–4.

Prakash S, Ambrosio E, Alguacil LF, Del Olmo N. Genetic differences in hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience.* 2009 Jun 30; 161(2):342-6. doi: 10.1016/j.neuroscience. 2009.03.061. Epub 2009 Mar 28.

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, 1000-10.

Puhl MD, Blum JS, Acosta-Torres S, Grigson PS. Environmental enrichment protects against the acquisition of cocaine self-administration in adult male rats, but does not eliminate avoidance of a drug-associated saccharin cue. *Behav Pharmacol.* 2012 Feb;23(1):43-53. Doi: 10.1097/FBP. 0b013e32834eb060.

Puighermanal, E., Marsicano, G., Busquets-garcia, A., Lutz, B., & Maldonado, R. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling, (August). <http://doi.org/10.1038/nn.2369>.

Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Gomis-González, M., Marsicano, G., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2013). Dissociation of the pharmacological effects of THC by mTOR blockade. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(7), 1334–43.

Quirion, R., Zajac, J. M., Morgat, J. L., and Roques, B. P. (1983). Autoradiographic distribution of mu and delta opiate receptors in rat brain using highly selective ligands. *LifeSci.* 33 (Suppl.1), 227–230. doi:10.1016/0024-3205(83) 90484-8.

Randall MD (2007). Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol*; 152:671-75.

Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:960–7.

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR et al. (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270: 792–794.

Rex, A., Sondern, U., Voigt, J.P., Franck, S., Fink, H., 1996. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 54, 107-11.

Reyes BA, Rosario JC, Piana PM, Van Bockstaele EJ (2009b) Cannabinoid modulation of cortical adrenergic receptors and transporters. *J Neurosci Res* 87:3671–3678.

Reyes B, Szot P, Sikkema C, Cathel A, Kirby L, Bockstaele EV (2012) Stress-induced sensitization of cortical adrenergic receptors following a history of cannabinoid exposure. *Experimental Neurology* 236:327–335.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Breliere, J.C., Le Fur, G.L., 1998. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 284, 644-50.

Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA (2001) G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 92:71–87.

Rios C, Gomes I, Devi LA (2006) Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148:387–395.

Rivera, P., Miguéns, M., Coria, S. M., Rubio, L., Higuera-Matas, A., Bermúdez-Silva, F. J., ... Ambrosio, E. (2013). Cocaine self-administration differentially modulates the expression of endogenous cannabinoid system-related proteins in the hippocampus of Lewis vs. Fischer 344 rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 16(6), 1277–93.

Roberts JD, Gennings C, Shih M (2006) Synergistic affective analgesic interaction between delta-9-tetrahydrocannabinol and morphine. *Eur J Pharmacol* 530:54–58.

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, 114-22.

Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21:823–833.

Roma, P. G., Flint, W. W., Higley, J. D., & Riley, A. L. (2006). Assessment of the aversive and rewarding effects of alcohol in Fischer and Lewis rats. *Psychopharmacology*, 189(2), 187–99.

Roma, P. G., Davis, C. M., & Riley, A. L. (2007). Effects of cross-fostering on cocaine-induced conditioned taste aversions in Fischer and Lewis rats. *Developmental Psychobiology*, 49(2), 172–9.

Romero, J., de Miguel, R., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., 1998b. The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci.* 62, 351-63.

Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Vela G, Ruiz-Gayo M, Fuentes JA, Ramos JA. Autoradiographic analysis of cannabinoid receptor binding and cannabinoid agonist-

stimulated [35S] GTP gamma S binding in morphine-dependent mice. *Drug Alcohol Depend.* 1998 May 1; 50(3):241-9.

Ronesi, J., Lovinger, D.M., 2005. Induction of striatal long-term synaptic depression by moderate frequency activation of cortical afferents in rat. *J Physiol.* 562, 245-56.

Ross, R.A., Brockie, H.C., Pertwee, R.G., 2000. Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur. J. Pharmacol.* 401, 121–130.

Ross, R.A., Coutts, A.A., McFarlane, S.M., Anavi-Goffer, S., Irving, A.J., Pertwee, R.G., MacEwan, D.J., Scott, R.H., 2001. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology.* 40, 221-32.

Ross RA (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* 30(3): 156–163.

Ross HR, Gilmore AJ, Connor M. Inhibition of human recombinant T-type calcium channels by the endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine. *Br J Pharmacol* 2009; 156:740–50.

Rubino T, Massi P, Vigano D, Fuzio D, Parolaro D (2000) Long-term treatment with SR141716A, the CB1 receptor antagonist, influences morphine withdrawal syndrome. *Life Sci* 66:2213–2219.

Ryberg, E., Vu, H.K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., Sjogren, S., Greasley, P.J., 2005. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett.* 579, 259-64.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 152, 1092-101

Saario SM, Salo OM, Nevalainen T, et al. Characterization of the sulfhydrylsensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Chem Biol* 2005; 12:649–56.

Sagar, D.R., Smith, P.A., Millns, P.J., Smart, D., Kendall, D.A., Chapman, V., 2004. TRPV1 and CB (1) receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat. *Eur J Neurosci.* 20, 175-84.

Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Mackie K, Kaneko T, Conrath M (2001) CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *NeuroReport* 12:3689–3692.

Salzet, M., Breton, C., Bisogno, T., Di Marzo, V., 2000. Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response. *Eur. J. Biochem.* 267, 4917–4927.

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, 834-43.

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, 955-9.

Sanchez-Cardoso, P., Higuera-Matas, A., Martin, S., del Olmo, N., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C., Ambrosio, E., 2007. Modulation of the endogenous opioid system after morphine self-administration and during its extinction: a study in Lewis and Fischer 344 rats. *Neuropharmacology.* 52, 931-48.

Sánchez-Cardoso, P., Higuera-Matas, A., Martín, S., Miguéns, M., Del Olmo, N., García-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2009). Strain differences between Lewis and Fischer 344 rats in the modulation of dopaminergic receptors after morphine self-administration and during extinction. *Neuropharmacology*, 57(1), 8–17.

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, 429-38.

Sandin J, Georgieva J, Schott PA, Ogren SO, Terenius L (1997). Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci* 9: 194–197.

Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett* 2000; 472:39–44.

Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., George, S.R., O'Dowd, B.F., 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, 193-8.

Scavone JL, Mackie K, Van Bockstaele EJ (2010) Characterization of cannabinoid-1 receptors in the locus coeruleus: relationship with mu-opioid receptors. *Brain Res* 1312:18–31.

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, 278-87.

Schreff M, Schulz S, Wiborny D et al. Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport* 1998; 9:1031-1034.

Schoffelmeer AN, Hogenboom F, Wardeh G, De Vries TJ (2006) Interactions between CB1 cannabinoid and mu opioid receptors mediating inhibition of neurotransmitter release in rat nucleus accumbens core. *Neuropharmacology* 51:773–781.

Schröder W, Lambert DG, Ko MC, Koch T., 2014. Functional plasticity of the N/OFQ-NOP receptor system determines analgesic properties of NOP receptor agonists. *Br J Pharmacol.* 2014 Aug; 171(16):3777-800. doi: 10.1111/bph.12744.

Schwarz, H., Blanco, F.J., Lotz, M., 1994. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. *J. Neuroimmunol.* 55, 107–115.

Schwarzer C. 30 years of dynorphins--new insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacol Ther.* 2009 Sep; 123(3):353-70. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.05.006. Epub 2009 May 28.

Selim, M., Bradberry, C.W., 1996. Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between the Lewis and Fischer 344 rat strains. *Brain Res.* 716, 157-64.

Serhan CN, Fierro IM, Chiang N, Pouliot M (2001). Cutting edge: nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4. *J Immunol* 166: 3650–3654.

Selvas, A., Coria, S. M., Kastanauskaite, A., Fernaud-Espinosa, I., DeFelipe, J., Ambrosio, E., & Miguéns, M. (2015). Rat-strain dependent changes of dendritic and spine morphology in the hippocampus after cocaine selfadministration. *Addiction Biology*. <http://doi.org/10.1111/adb.12294>.

Shabalina SA, Zaykin DV, Gris P, Ogurtsov AY, Gauthier J, Shibata K, Tchivileva IE, Belfer I, Mishra B, Kiselycznyk C, Wallace MR, Staud R, Spiridonov NA, Max MB, Goldman D, Fillingim RB, Maixner W, Diatchenko L. Expansion of the human mu-opioid receptor gene architecture: novel functional variants. *Hum.Mol.Genet.* 2009; 18: 1037–1051.

Sharir H, Console-Bram L, Mundy C, Popoff SN, Kapur A, Abood ME The Endocannabinoids Anandamide and Virodhamine Modulate the Activity of the Candidate Cannabinoid Receptor GPR55. *J Neuroimmune Pharmacol* (2012).

Sheng, W.S., Hu, S., Min, X., Cabral, G.A., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., 2005. Synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia.* 49, 211-9.

Sheskin T, Hanus L, Slager J, Vogel Z, Mechoulam R. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J Med Chem* 1997; 40:659–67.

Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P., 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem.* 270, 3726-31.

Shoaib, M., Schindler, C.W., Goldberg, S.R., 1997. Nicotine self-administration in rats: strain and nicotine pre-exposure effects on acquisition. *Psychopharmacology (Berl).* 129, 35-43.

Shoemaker JL, Joseph BK, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL. The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314:868–75.

Simon GM y Cravatt BF (2006). Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acylethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem*; 281:26465-72.

Singh SR, Sullo N, D'Agostino B, Brightling CE, Lambert DG (2013). The effects of nociceptin peptide (N/OFQ)-receptor (NOP) system activation in the airways. *Peptides* 39: 36–46.

Sircar, R., Kim, D., 1999. Female gonadal hormones differentially modulate cocaine-induced behavioral sensitization in Fischer, Lewis, and Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 289, 54-65.

Slipetz, D.M., O'Neill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., Metters, K.M., 1995. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 48, 352-61.

Smith PA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Welch SP (2007) Low dose combination of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. *Eur J Pharmacol* 571:129–137.

Starowicz K, Makuch W, Osikowicz M, et al. Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: possible CB(1)- and TRPV1-mediated mechanisms. *Neuropharmacology* 2012; 62:1746–55.

Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP. 2008. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139:225–236.

Sternberg, E.M., Young, W.S., 3rd, Bernardini, R., Calogero, A.E., Chrousos, G.P., Gold, P.W., Wilder, R.L., 1989. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 4771-5.

Strecker, R.E., Eberle, W.F., Ashby, C.R., Jr., 1995. Extracellular dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens of Fischer and Lewis rats: basal levels and cocaine-induced changes. *Life Sci.* 56, PL135-41.

Stohr, T., Schulte Wermeling, D., Weiner, I., & Feldon, J. (1998). Rat strain differences in open-field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 59(4), 813–818.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:89–97.

Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(2-3): 173-193

Sugiura T, Kishimoto S, Oka S y Gokoh M (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*; 45:405-46.

Sun, Alexander Y, Kendall SP, Bennett DA, Cannabinoids AJ. PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:1095–7.

- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., Gilman, A.G., 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36, 461-80.
- Suzuki, T., Otani, K., Koike, Y., & Misawa, M. (1988). Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *Japanese Journal of Pharmacology*, 47(4), 425–431.
- Suzuki, T., Miura, M., Nishimura, K., Aosaki, T., 2001. Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 21, 6492-501.
- Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. a, & Rusakov, D. a. (2013). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 5193–8.
- Szabo B, Schlicker E (2005) Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*: 327–365.
- Takita K, Morimoto Y, Kemmotsu O (2003). Roles of nociceptin/orphanin FQ and nociceptin/orphanin FQ peptide receptor in respiratory rhythm generation in the medulla oblongata: an *in vitro* study. *Br J Anaesth* 91: 385–389.
- 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, 2048-50.
- Taylor AH, Amoako AA, Bambang K, et al. Endocannabinoids and pregnancy. *Clin Chim Acta* 2010; 411:921–30.
- Tejeda, H. A., Shippenberg, T. S., and Henriksson, R. (2012). The dynorphin/kappa-opioid receptor system and its role in psychiatric disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 857–896. doi:10.1007/s00018-011- 0844-x.
- Tempel A, Zukin RS (1987) Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4308–4312.
- Terranova, J.P., Storme, J.J., Lafon, N., Perio, A., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Soubrie, P., 1996. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology (Berl)*. 126, 165-72.
- Thompson AA, Liu W, Chun E, Katritch V, Wu H, Vardy E *et al.* (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 485: 395–399.
- Tseng LF, Narita M, Suganuma C *et al.* Differential antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:576-583.
- 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, 393-411.

- Tsuboi K, Zhao LY, Okamoto Y, et al. Predominant expression of lysosomal N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages revealed by immunochemical studies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 623–32.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem*. 1995 Oct 6; 270(40):23823-7.
- Valenza, M., Picetti, R., Yuferov, V., Butelman, E. R., & Kreek, M. J. (2016). Strain and cocaine-induced differential opioid gene expression may predispose Lewis but not Fischer rats to escalate cocaine self-administration. *Neuropharmacology*.
- Valverde O, Noble F, Beslot F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (2001) Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur J Neurosci* 13:1816–1824.
- Van der Staay, F. J., Schuurman, T., van Reenen, C. G., & Korte, S. M. (2009). Emotional reactivity and cognitive performance in aversively motivated tasks: a comparison between four rat strains. *Behavioral and Brain Functions: BBF*, 5, 50.
- Van der Stelt M, van Kuik JA, Bari M, et al. Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem* 2002; 45:3709-20.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., ... Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 329–32.
- Vela G, Ruiz-Gayo M, Fuentes JA. Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine. *Neuropharmacology* 1995;34(6):665-8.
- Vigano D, Rubino T, Parolaro D (2005a) Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav* 81:360–368.
- Vigano D, Rubino T, Vaccani A, Bianchessi S, Marmorato P, Castiglioni C, Parolaro D (2005b) Molecular mechanisms involved in the asymmetric interaction between cannabinoid and opioid systems. *Psychopharmacology* 182:527–536.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2, 489-501.
- Vuong LA, Mitchell VA, Vaughan CW. Actions of N-arachidonyl-glycine in a rat neuropathic pain model. *Neuropharmacology* 2008; 54:189–93.
- Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., Malli, R., & Graier, W. F. (2008). Integrin clustering enables anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 121, 1704–1717.

- Wakeford, A. G. P., & Riley, A. L. (2014). Conditioned taste avoidance induced by  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol in the Fischer (F344) and Lewis (LEW) rat strains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 116, 39–44.
- Ward, A.S., Li, D.H., Luedtke, R.R., Emmett-Oglesby, M.W., 1996. Variations in cocaine self-administration by inbred rat strains under a progressive-ratio schedule. *Psychopharmacology (Berl)*. 127, 204-12.
- Welch SP (2009) Interaction of the cannabinoid and opioid systems in the modulation of nociception. *Int Rev Psychiatry* 21:143–151.
- 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, 637-52
- Wettschureck N, van der Stelt M, Tsubokawa H, Krestel H, Moers A, Petrosino S y cols (2006). Forebrain-specific inactivation of Gq/G11 family G proteins results in age-dependent epilepsy and impaired endocannabinoid formation. *Mol Cell Biol*; 26:5888-94.
- Witta J, Palkovits M, Rosenberger J, Cox BM (2004). Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res* 997: 24–29.
- Xu J, Xu M, Hurd YL, Pasternak GW, Pan YX. Isolation and characterization of new exon 11-associated N-terminal splice variants of the human mu opioid receptor gene. *J.Neurochem*. 2009; 108: 962–972.
- Xu J, Xu M, Rossi GC, Pasternak GW, Pan YX. Identification, characterization of seven new exon 11-associated splice variants of the rat mu opioid receptor gene, OPRM1. *Mol. Pain*. 2011; 7:9.
- Yamaguchi T, Hagiwara Y, Tanaka H, Sugiura T, Waku K, Shoyama Y, et al. Endogenous cannabinoid, 2- arachidonoylglycerol, attenuates naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent mice. *Brain Res* 2001; 909(1-2):121-6.
- Yang, H.Y., Karoum, F., Felder, C., Badger, H., Wang, T.C., Markey, S.P., 1999. GC/MS analysis of anandamide and quantification of N-arachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat. *J. Neurochem*. 72, 1959–1968.
- Yuan, M., Kiertscher, S.M., Cheng, Q., Zoumalan, R., Tashkin, D.P., Roth, M.D., 2002. Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J. Neuroimmunol*. 133, 124–131.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ et al. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 1997; 386:499-502.
- Zhang J, Salojin KV, Gao JX, Cameron MJ, Bergerot I, Delovitch TL (1999). P 38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells. *J Immunol* 162: 3819–3829.
- Zhang, H.-Y., Gao, M., Liu, Q.-R., Bi, G.-H., Li, X., Yang, H.-J., ... Xi, Z.-X. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and

dopamine-related behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <http://doi.org/10.1073/pnas.1413210111>

Ziring, D., Wei, B., Velazquez, P., Schrage, M., Buckley, N.E., Braun, J., 2006. Formation of B and T cell subsets require the cannabinoid receptor CB2. *Immunogenetics* 58, 714–725.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400, 452-7.