

Guía Básica sobre los Cannabinoides

**SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE INVESTIGACIÓN
SOBRE CANNABINOIDES**

Financiado por



DELEGACIÓN DEL
GOBIERNO PARA
EL PLAN NACIONAL
SOBRE DROGAS

I.S.B.N.: 84-699-8658-9
Depósito Legal: M-29044-2002

Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides **(SEIC)**
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
28040-Madrid

e-mail: seic@med.ucm.es
<http://www.ucm.es/info/seic-web/>
teléfono: 91-3941450
fax: 91-3941691

Índice

Prólogo	5
Autores	7
Aspectos generales sobre los cannabinoides	
Capítulo 1. Química y metabolismo de los cannabinoides	13
<i>Sara González, Onintza Sagredo, María Gómez y José Antonio Ramos.</i>	
Capítulo 2. Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno	23
<i>Fernando Berrendero.</i>	
Capítulo 3. Farmacología de los receptores para cannabinoides	33
<i>Angel Pazos y Susana Mato.</i>	
Capítulo 4. Mecanismos de transducción de señales de los cannabinoides	43
<i>Inés Díaz Laviada.</i>	
Capítulo 5. Procesos de finalización de la señal biológica: sistema de inactivación de los endocannabinoides	53
<i>Mariluz López Rodríguez, Alma Viso y Silvia Ortega.</i>	
Capítulo 6. Distribución del sistema endocannabinoide en el organismo.....	67
<i>Julián Romero.</i>	
Fisiología, farmacología y terapéutica de los cannabinoides	
Capítulo 7. Cannabinoides y control nociceptivo	75
<i>Antonio J. Carrascosa y Jorge Manzanares.</i>	

- Capítulo 8. Cannabinoides y actividad motora 83
Isabel Lastres-Becker, Ana Cabranes, Eva de Lago y Javier Fernández Ruiz.
- Capítulo 9. Cannabinoides y procesos de memoria y aprendizaje 97
Paz Viveros.
- Capítulo 10. Acción de los cannabinoides sobre el sistema inmunitario 105
Ángel Martín-Arévalo, Eduardo Molina-Holgado y Carmen Guaza.
- Capítulo 11. Control de la decisión supervivencia/muerte celular por cannabinoides 113
Manuel Guzmán.

Los cannabinoides como drogas de abuso

- Capítulo 12. Tolerancia y dependencia de cannabinoides 121
Rafael Maldonado.
- Capítulo 13. Epidemiología del consumo de cannabis en jóvenes y adolescentes 135
Dolores Baño.
- Capítulo 14. Efectos psicológicos de los cannabinoides 145
Luis Núñez Domínguez.
- Capítulo 15. Tratamiento de la adicción a cannabis 153
Josep Solé.

Prólogo

No cabe ninguna duda de que vivimos tiempos excitantes para los que, como quienes escribimos algún capítulo de esta guía, nos dedicamos desde hace varios años a la investigación sobre los cannabinoides desde diferentes disciplinas científicas y formas de trabajo. Y son tiempos excitantes por bastantes razones aunque cabría destacar principalmente tres. Primero, por el avance, tanto cuantitativo como cualitativo, que está experimentando en la actualidad el conocimiento de estas sustancias y de sus mecanismos de actuación a nivel del organismo humano. Este avance es consecuencia principalmente de la descripción de que nuestro cerebro y también algunos órganos periféricos, fabrican, contienen y utilizan una serie de moléculas que denominamos cannabinoides endógenos o “endocannabinoides” que, aunque estructuralmente diferentes a los cannabinoides presentes en la marihuana, el hachís u otras preparaciones de la planta *Cannabis sativa*, forman parte de un sistema de modulación del organismo que contiene las dianas sobre las que actúan los cannabinoides vegetales. Una segunda razón que explica el auge de la investigación sobre los cannabinoides deriva de las expectativas que han creado las posibles aplicaciones terapéuticas de estas sustancias, un tema de evidente actualidad y que desborda de hecho la frontera de lo estrictamente científico o clínico. Los investigadores están poniendo de manifiesto que la manipulación farmacológica de este nuevo sistema de modulación con moléculas progresivamente más selectivas, en cuanto a las dianas sobre las que pueden actuar, puede proporcionar beneficio terapéutico en diversas patologías, algunas de ellas huérfanas hasta el momento de eficaces tratamientos farmacológicos. Por último, se debe también mencionar que, a partir de la descripción de los distintos elementos que forman parte del sistema endocannabinoide, se empieza a disponer de las suficientes herramientas para analizar con objetividad el fenómeno del abuso de cannabis, una droga para la que, la falta de datos concluyentes acerca del mecanismo de actuación a nivel cerebral de sus principios activos, ha sumido en una situación de relativa interinidad que ha permitido interpretaciones extremas acerca de sus efectos sobre la salud, o bien comparándola en toxicidad con otras drogas como la heroína o la cocaína, o bien considerándola como poco peligrosa e, incluso, saludable.

No obstante, a pesar de lo que las tres anteriores razones apuntan, los investigadores en esta área podemos constatar que todavía hay una falta evidente de información objetiva sobre los cannabinoides, probablemente como consecuencia del retraso de la investigación básica y aplicada sobre estas sustancias comparadas con los principios activos de otras drogas que también presentan dos caras de una misma moneda, es decir, potencial uso recreacional y utilidad terapéutica. Ahora que empezamos a conocer como actúan estas sustancias, es momento de asentar las bases para que la información sobre el avance de estos conocimientos se haga de forma objetiva y racional y éste es el principal objetivo de la guía que tienes en las manos. Todos sus autores, miembros de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC), hemos querido con esta obra dar respuesta al desafío de transmitir una información objetiva y racional sobre estas sustancias, planteada desde una perspectiva científica y avalada por el trabajo investigador que todos nosotros desarrollamos. Es un derecho del lector juzgar si lo hemos conseguido o no. Para que nos puedas transmitir tus opiniones al respecto, hemos abierto un espacio en la dirección Web de la SEIC (www.ucm.es/info/seic-web) a través del que nos podrás hacer llegar tus opiniones, dudas y preguntas. Con ello, nos ayudarás a mejorar futuras nuevas ediciones que incorporen los nuevos avances en el conocimiento de estas sustancias.

SEIC

Autores

Angel Arévalo-Martín

Grupo de Neuroinmunología, Departamento de Plasticidad Neural.
Instituto Cajal, CSIC, Madrid.

M^a Dolores Baño

Programa Municipal de Drogas.
Majadahonda, Madrid.

Fernando Berrendero

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

Ana Cabranes

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

Antonio J. Carrascosa

Servicio de Anestesiología y Reanimación.
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Eva de Lago

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

Inés Díaz-Laviada

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

Javier Fernández-Ruiz

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

María Gómez

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

Sara González

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

Carmen Guaza

Grupo de Neuroinmunología, Departamento de Plasticidad Neural.
Instituto Cajal, CSIC, Madrid.

Manuel Guzmán

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

Isabel Lastres-Becker

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

María Luz López-Rodríguez

Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Complutense de Madrid.

Rafael Maldonado

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

Jorge Manzanares

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

Susana Mato

Departamento de Fisiología y Farmacología.
Universidad de Cantabria, Santander.

Eduardo Molina-Holgado

Grupo de Neuroinmunología, Departamento de Plasticidad Neural.
Instituto Cajal, CSIC, Madrid.

Luis Núñez-Domínguez

Clínica San Francisco Javier.
Pamplona, Navarra.

Silvia Ortega-Gutiérrez

Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Complutense de Madrid.

Angel Pazos

Departamento de Fisiología y Farmacología.
Universidad de Cantabria, Santander.

José Antonio Ramos

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

Julián Romero

Laboratorio de Apoyo a la Investigación.
Fundación Hospital Alcorcón, Madrid.

Onintza Sagredo

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

Josep Solé Puig

B.Menni C.A.S.M.
Sant Boi, Barcelona.

Alma Viso

Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Complutense de Madrid.

Paz Viveros

Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid.



**Aspectos generales sobre
los cannabinoides**

Química y metabolismo de los cannabinoides

1

S. González, O. Sagredo, M. Gómez y J.A. Ramos

1.1. Propiedades de los cannabinoides

✓ Los cannabinoides son sustancias que suelen tener una estructura carbocíclica con 21 carbonos y están formados generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Los principales cannabinoides son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN). Otros cannabinoides presentes en la planta son el cannabicromeno (CBC), cannabiciolol (CBL), cannabigerol (CBG), monometiléter del cannabigerol (CBGM), cannabielsoina (CBE), cannabinodiol (CBND), cannabitriol (CBT), dehidrocannabifurano y cannabicitrano, que aparecen en cantidades diferentes según la variedad de cannabis sativa valorada. El ácido cannabidiólico, que tiene actividad antibiótica, es un constituyente importante del cáñamo del tipo fibra (Turner y cols., 1980).

El Δ^9 -THC es el cannabinoide con mayor potencia psicoactiva. Presenta propiedades hidrofóbicas por lo que es muy soluble en lípidos. Esto hace que su distribución en el organismo y su eliminación presenten diferencias con lo descrito para otras drogas de abuso. El Δ^8 -THC tiene un perfil farmacológico muy parecido al del Δ^9 -THC, aunque sus efectos son más débiles. Sólo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es muy pequeña en comparación con la del Δ^9 -THC (Mechoulam y cols., 1992).

✓ El cannabinol (CBN) también tiene propiedades psicoactivas, que son aproximadamente una décima parte de las descritas para el THC. Presenta mayor afinidad por el receptor CB2 que por el CB1. Su actuación sobre el receptor CB2 en esplenocitos y timocitos, al inhibir la adenilato ciclasa, reduce la actividad de la proteína quinasa A y de los factores de transcripción dependientes del AMPc. Esta reducción, implica, a nivel genético, una disminución en la transcripción del gen para la interleuquina-2 (IL-2). La disminución de la liberación de IL-2 podría contribuir a explicar la capacidad de inmunomodulación atribuida a los cannabinoides, dado que esta proteína participa en la regulación de la actividad del sistema inmune (Condie y cols., 1996).

El cannabidiol (CBD) es un compuesto bicíclico, al estar el anillo de tetrahidropirano escindido. Es un cannabinoide prácticamente desprovisto de propiedades psicoactivas, por lo que se están investigando sus posibles efectos clínicos. Así, el tratamiento con CBD atenúa algunas de las alteraciones psicológicas inducidas por altas dosis de THC (0,5 mg/kg), como por ejemplo los sentimientos de ansiedad y de pánico (Zuardi y cols., 1982).

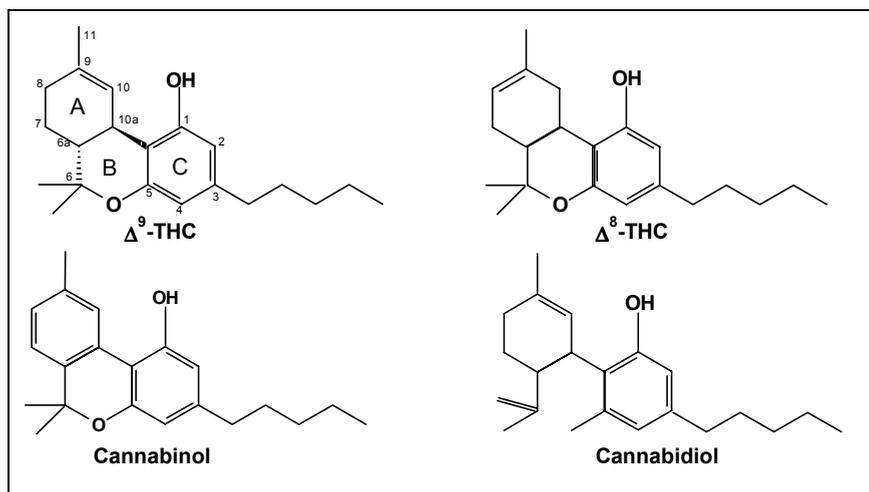


Figura 1.1. Estructura química de los cannabinoide naturales más importantes.

Se ha atribuido al CBD un papel neuroprotector al comprobar su actuación como antioxidante frente a los efectos oxidativos producidos en las neuronas por la liberación de glutámico (Hampson y cols., 1998). También ha sido relacionado desde hace tiempo con el sistema inmune. Recientemente se ha visto que en algunas líneas celulares del sistema inmune inhibe la producción de diversas citoquinas (IL-8, IL-10, TNF- α , IFN γ). Estos resultados, que indican sus posibles efectos beneficiosos en enfermedades inflamatorias/autoinmunes, también advierten de su peligrosidad en relación con el SIDA, tumorigénesis e inflamación alérgica en pulmones (Srivastava y cols., 1998).

Se ha visto en un modelo experimental de artritis en ratón que el tratamiento con CBD bloquea la progresión de la enfermedad, tanto cuando se administra por vía oral como cuando se hace intraperitonealmente. Los efectos antiartríticos de este compuesto podrían ser el resultado de su actividad inmunosupresora, especialmente de la respuesta de los linfocitos Th1 y de una acción antiinflamatoria que reduciría los niveles de TNF en la sinovia (Malfait y cols., 2000).

1.2. Relación estructura-actividad

El conocimiento de las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los cannabinoide ha permitido el diseño de compuestos análogos que han sido de gran utilidad en el estudio farmacológico y fisiológico de estas sustancias. En unos

casos, se ha modificado el marcado carácter hidrofóbico de los cannabinoides para aumentar su solubilidad en agua. Otras veces, se ha aumentado la afinidad por su receptor. Además, las sucesivas modificaciones de su estructura han permitido la preparación de derivados relacionados con alguna de las acciones atribuidas a estos compuestos, evitando las relativas a sus efectos psicotrópicos.

Así, en relación con los efectos analgésicos de los cannabinoides se diseñaron análogos sintéticos tetracíclicos, como el levonantradol y bicíclicos, como el (-)-CP-55,940. Este último compuesto ha sido utilizado para la caracterización del receptor de cannabinoides (Howlett *y cols.*, 1988). Otros cannabinoides sintéticos con propiedades terapéuticas son la nabilona y el naboctate. El primero posee, en el carbono nueve, un grupo cetónico en lugar de un metilo, lo que le confiere un apreciable efecto antiemético. La presencia en el segundo de un grupo dietil-etilamino esterificado en el hidroxilo fenólico implica la reducción de la presión intraocular (Razdan, 1986). El 11-hidroxi- Δ^8 -THC-DMH (HU-210) es el cannabinoide sintético más potente de los actualmente conocidos. Esta propiedad está relacionada con la presencia de un grupo hidroxilo en C11 y de 1,1, dimetilheptilo en su cadena lateral. Su elevada potencia fue clave para la caracterización de la anandamida, que ha sido el primer cannabinoide endógeno aislado de cerebro.

Los aminoalquilindoles no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides, pero muestran un perfil farmacológico cannabimimético. Uno de ellos, el WIN-55212-2 se une al receptor de cannabinoides, inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa, por lo que se ha utilizado en la caracterización de este receptor (Bell *y cols.*, 1991).

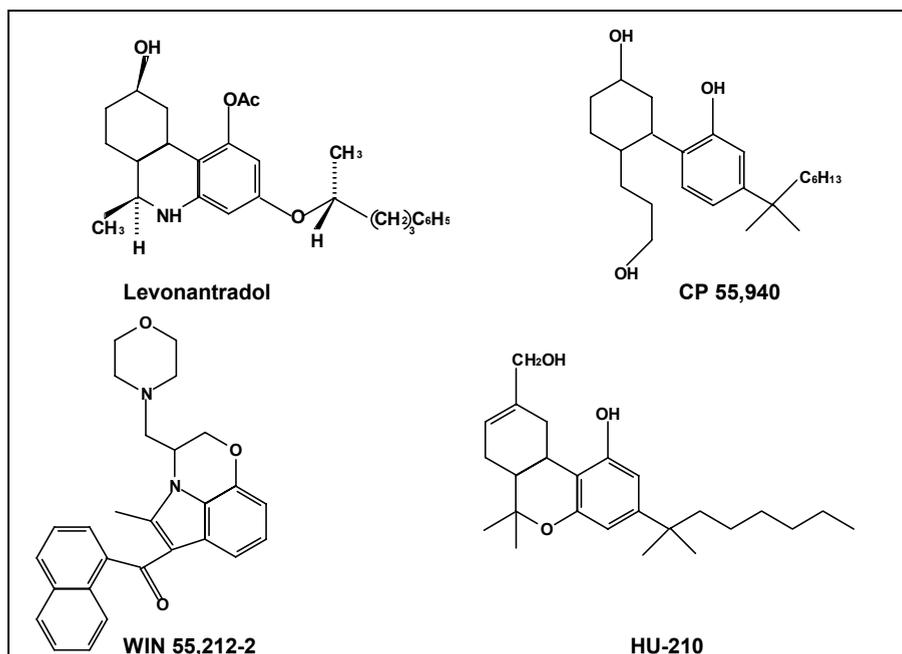


Figura 1.2. Estructura química de los cannabinoides sintéticos más representativos.

La anandamida y el 2-araquidonilglicerol, que son los dos cannabinoides endógenos, mejor caracterizados, tienen una estructura química muy diferente a la del Δ^9 -THC y carecen de sus propiedades psicotrópicas. Se están diseñando compuestos a partir de su estructura a la búsqueda de una aplicación terapéutica sin los efectos secundarios producidos por los cannabinoides de origen vegetal.

1.3. Absorción y metabolismo

Cuando los preparados de la *Cannabis sativa L.* (hachís, marihuana) se consumen en forma de cigarrillos son absorbidos por los pulmones, junto con los otros componentes del humo. La entrada del THC en sangre y la posterior distribución en tejidos son muy rápidas y presentan una cinética similar a la obtenida tras su administración intravenosa. La máxima concentración de THC en sangre se alcanza antes de que finalice el consumo del cigarro.

La ingestión de los cannabinoides por vía oral da lugar a unos niveles plasmáticos de THC inicialmente más bajos que cuando se toma por inhalación. Por vía oral su biodisponibilidad se ve reducida por su sensibilidad a la acidez del jugo gástrico, por el metabolismo hepático e intestinal, así como por su acceso a la circulación enterohepática (Agurell y cols., 1986). Por tanto, hay que ingerir una cantidad mayor de THC por esta vía para conseguir el mismo efecto fisiológico que por la respiratoria y además conduce a unos niveles plasmáticos mucho más erráticos que los observados después de fumar.

Solo un 3% del THC presente en sangre está en forma libre. Dada su elevada hidrofobicidad se une a diferentes componentes plasmáticos. Un 9% está unido a las células sanguíneas. Otro 60% lo está a las lipoproteínas plasmáticas y el resto a albúmina. Esta misma propiedad explica su rápida penetración en los tejidos, sobre todo en aquellos que están altamente vascularizados: pulmón, hígado, riñón, corazón, estómago, bazo, tejido adiposo marrón, placenta, corteza adrenal, tiroides, pituitaria y glándula mamaria. Posteriormente pasa al tejido adiposo, que junto con el bazo son sus principales depósitos tres días después de su ingesta. La droga puede tardar varias semanas en ser totalmente eliminada tras el cese de su administración (Harvey, 1999). Su retención en estos reservorios hidrofóbicos amortigua la penetración del THC en el cerebro, donde su concentración y la de sus metabolitos es más baja (suele ser un 1% de la concentración plasmática máxima) (Agurell y cols., 1986).

El THC y su metabolito, el 11-hidroxi-THC (11-OH-THC) son los que en mayor proporción se acumulan en los tejidos. Una parte del THC aparece conjugada con ácidos grasos, sobre todo en la fase final del almacenamiento. La paulatina liberación del THC, desde estos almacenes tisulares a la sangre, enlentece la caída de los niveles plasmáticos de este compuesto, tras el cese de su administración. Esto prolonga su presencia en sangre y la posterior entrada al cerebro, lo que podría explicar las dificultades para identificar un síndrome de abstinencia a esta droga, tras la suspensión de su administración (Agurell y cols., 1986).

La eliminación del THC se produce principalmente mediante sus metabolitos en heces (un 68%) o en orina (12%), aunque también lo hace a través del pelo, la saliva y el sudor. La mayor parte del metabolismo ocurre en el hígado, aunque

también puede producirse en otros órganos como el pulmón y el intestino. En orina se detecta la presencia de 11-OH-THC y hay una elevada concentración de ácido THC-11 oico, ambos en forma libre o conjugada. La concentración de este ácido, no muestra una correlación apreciable con la cantidad presente en sangre, aunque los resultados son más precisos cuando lo que se comparan son los logaritmos de estas concentraciones (Huestis *y cols.*, 1996). La primera enzima que actúa en el catabolismo del δ^9 -THC es el citocromo P-450 que lo oxida a derivados mono- di- o trihidroxilados. La primera hidroxilación suele producirse en el hígado a 11-OH-THC (Matsunaga *y cols.*, 1995). Este compuesto tiene una actividad farmacológica parecida a la del THC y puede oxidarse al ácido Δ^9 -THC-11-oico (THC-11-COOH) o volver a hidroxilarse. En el segundo caso se convierte en 8,11-dihidroxi- Δ^9 -THC, que puede ser hidroxilado en la cadena lateral. Estos compuestos hidroxilados son transformados, posteriormente, en otros metabolitos más polares, por rotura de la cadena lateral y oxidación al correspondiente ácido carboxílico. El que se haya encontrado CBN y sus derivados en orina y bilis de animales a los que se les administró THC, parece indicar que el CBN es un metabolito del THC (Harvey, 1984).

El retraso de la aparición de los efectos psicológicos y cardíacos del THC con respecto a la elevación de sus niveles en plasma puede estar relacionado con la más tardía aparición en sangre de la máxima concentración de 11-OH-THC. Al tratarse de un compuesto psicoactivo, su presencia en cerebro potenciaría los efectos iniciados por el THC. El THC-11-COOH se detecta algunos minutos después de la finalización del consumo y su concentración crece lentamente hasta que alcanza una meseta durante un periodo prolongado de tiempo, pudiendo llegar a superar hasta 5 veces los niveles de THC. El máximo nivel se alcanza entre 30 min y una hora después de haberlo fumado (Huestis *y cols.*, 1992).

Los metabolitos de los cannabinoides son eliminados en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónico. Estos últimos se almacenan en el cuerpo durante periodos relativamente prolongados de tiempo y pueden llegar a ser detectados en la orina varias semanas después del consumo de los cannabinoides. Un segundo tipo de conjugación implica la esterificación del 11-OH-THC con ácidos grasos de cadena larga como el palmítico, el oleico y el estearico (Aguirell *y cols.*, 1986).

También se ha podido demostrar en ratas preñadas que los cannabinoides pueden pasar a través de la placenta desde la sangre materna a la fetal. Durante el embarazo, los niveles presentes en los fetos corresponden aproximadamente al 10% de los niveles plasmáticos maternos. La exposición repetida a múltiples dosis produce la acumulación de dichos compuestos en los fetos, ya que estos no parecen disponer todavía de los mecanismos necesarios para su degradación. Los cannabinoides también son excretados en la leche materna durante la lactancia, lo que implica la exposición de las crías a este compuesto (Fernández-Ruiz *y cols.*, 1992).

1.4. Interacciones entre cannabinoides

La actuación del THC en el organismo puede ser modificada por el resto de los compuestos presentes en la *Cannabis sativa L.* El escaso número de datos disponibles sobre las propiedades de la mayoría de estos compuestos hace muy difícil poder

predecir como podrían interferir en la actuación del THC y si el efecto producido es sinérgico, aditivo o antagonico.

La actuación de estos compuestos también puede estar relacionada con la forma de administración de la muestra. Así cuando la droga se fuma mezclada con tabaco, hay que tener en cuenta, además de la existencia de compuestos procedentes del tabaco, que la pirólisis origina nuevos productos químicos a partir de los procedentes de la planta que también podrían influir en los efectos de los cannabinoides sobre el organismo.

✓ Cuando se compara la combustión del cannabis con la del tabaco, se observa que la presencia del carcinógeno benzopireno es superior en la primera. También son mas elevadas las concentraciones de benzoantraceno, y de diversos naftalenos. Las cantidades producidas de monóxido de carbono, cianhídrico, nitrosaminas y alquitranes es similar en ambos casos (Lee y cols., 1976).

Una vez producida su administración, las interacciones entre los diferentes compuestos presentes en un preparado de cannabis pueden tener lugar en alguna de las etapas que podemos diferenciar durante su paso por el organismo (absorción, distribución, metabolismo o eliminación). Diversos estudios han demostrado una interacción farmacocinética entre el CBD y el THC y sus metabolitos en cerebro de ratón (Bornheim y cols., 1994). El CBD es un inhibidor de la actividad de la forma 3A del citocromo P-450 hepático en humanos y de la forma 2C9 en ratón (Jaeger y cols., 1996). Este resultado aumentara la permanencia del THC en el organismo, lo que implica que el CBD, que no tiene actividad psicotrópica por si mismo, puede potenciar la producida por el THC.

En rata, el CBD potencia los efectos analgésicos del THC y antagoniza los depresores. También parece bloquear los efectos excitatorios producidos por este compuesto. Esto último ha sido comprobado en animales privados de sueño, en los que el CBD disminuye la agresividad causada por la administración de THC (Karniol y Carlini, 1973). El CBD también reduce otros efectos atribuidos al THC en ratas (magnitud y duración de los efectos hipotérmicos) y en conejos (frecuencia cardiaca, respiración y temperatura).

Se ha observado que un extracto de cannabis conteniendo entre un 3 y un 5% de THC, CBD y CBN aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que puede contribuir a una mayor entrada de estos compuestos al cerebro en grupo que por separado (Agrawal y cols., 1989). La administración conjunta de estos tres cannabinoides a ratas macho potencia la inhibición producida por THC de la liberación de la hormona luteinizante (LH). Dado que la LH activa la liberación de testosterona, otro de los efectos de la presencia conjunta de los tres cannabinoides es una disminución de los niveles de testosterona en plasma (Murphy y cols., 1990).

Los estudios realizados con diversas combinaciones de THC, CBN y CBD, indican que los estímulos discriminativos producidos por el THC son generalmente de mayor intensidad o duración cuando se administra en combinación con los otros dos compuestos. Cuando THC se uso en ratas junto con CBD, se prolongó el tiempo de duración de estos estímulos discriminativos. Cuando se empleó THC y CBN aumentó la discriminación a los estímulos producidos por el THC en ratas, aunque no se logró que se prolongara el efecto. Cuando se combinan CBD y CBN se observa que el primero puede reducir los efectos estimulantes del segundo (Järbe y Mathis, 1992).

En cuanto al sistema cannabinoide endógeno, se ha visto en microsomas de cerebro de ratón que la actividad de la anandamida amidasa es inhibida en orden decreciente por CBD, CBN y THC (Watanabe *y cols.*, 1996). Dado que esta enzima inactiva a la anandamida, la presencia en el cerebro de este cannabinoide endógeno podría prolongarse tras la ingesta conjunta de estos componentes del cannabis.

En relación con las interacciones producidas entre el THC y alguno de los productos de su metabolismo, el ácido THC-11 COOH, que no tiene propiedades psicoactivas, atenúa los efectos catalépticos producidos por el THC en ratón. La explicación de este resultado podría radicar en que este ácido inhibe la síntesis inducida por THC de prostaglandinas, al actuar sobre la ciclooxigenasa COX-2, que es una de las enzimas implicadas en dicha síntesis (Burstein *y cols.*, 1987).

El ácido THC-11 COOH también parece inhibir la lipooxigenasa-5 (5-LOX). La inhibición de la actividad de ambas enzimas aumenta los niveles de ácido araquidónico, que podría derivar hacia otras rutas metabólicas de las que lo utilizan como sustrato. Una de ellas conduciría al aumento de la síntesis de los ácidos 12-hidroperoxi-eicosatetraenoicos (12-HPETE), lo que justificaría los efectos analgésicos atribuidos a estos compuestos. El metabolismo del THC habría eliminado, en este caso las propiedades psicotrópicas, conservando las analgésicas y las antiinflamatorias (Burstein, 1999).

Bibliografía

- Agrawal AK, Kumar P, Gulati A y Seth PK (1989) Cannabis induced neurotoxicity in mice: effect of cholinergic (muscarinic) receptors and blood barrier permeability. *Res. Commun. Subst. Abuse*. **10**:155-168.
- Agurell S, Halldin M, Lindgren J, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H y Hollister L (1986) Pharmacokinetics and metabolism of delta-9-THC and other cannabinoids with emphasis on man, *Pharmacol. Rev.* **38**:21-42.
- Bell MR, D'Ambra TE, Kumar V, Eissenstat MA y Herrman JL (1991) Antinociceptive (aminoalkyl)-indoles. *J. Med. Chem.* **34**:1099-1110.
- Bornheim LM, Everhart ET, Li J y Correia MA (1994) Induction and genetic regulation of mouse hepatic cytochrome P-450 by cannabidiol *Biochem. Pharmacol.* **48**:161-71.
- Burstein S, Hunter SA, Latham V y Renzulli L (1987) A major metabolite of δ^1 -THC reduces its cataleptic effect in mice. *Experientia*. **43**:402-3.
- Burstein S (1999) The cannabinoid acids: nonpsychoactive derivatives with therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* **82**:87-96.
- Condie R, Herring A, Koh WS, Lee M y Kaminski NE (1996) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J. Biol. Chem.* **271**:13175-13183.
- Fernandez-Ruiz JJ, Rodriguez F, Navarro M y Ramos JA (1992) Maternal cannabinoid exposure and brain development: changes in the ontogeny of dopamine neurons. en *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Bartke A, Murphy LL, Eds., Biochemistry and physiology os substance abuse, vol IV, CRC Press, Boca Ratón, FL., pgs 119-164.

- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J y Wink D (1998) Cannabidiol and (-)- δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:8268-8273.
- Harvey DJ (1984) Chemistry, metabolism and pharmacokinetics of the cannabinoids en Nahas GG ed pg 37-107. Raven Press. New York.
- Harvey DJ (1999) Absorption, distribution and biotransformation of the cannabinoids en Nahas GG, Sutin KM, Harvey DJ y Agurell S. Humana Press. Totowa. New Jersey. pg 91-103.
- Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS y Milhe GM (1988) Nonclassical cannabinoid analgetic inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol. Pharmacol.* **33**:297-302.
- Huestis MA, Henningfield JE y Cone EJ (1992) Blood cannabinoids: I Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THC-COOH during and after smoking marihuana. *J. of Analytical Toxicology*. **16**:276-286.
- Huestis MA, Mitchell JM y Cone EJ (1996) Urinary excretion of 11-nor-9-carboxy- δ^9 -tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marihuana. *J. of Analytical Toxicology*. **20**:441-52.
- Jaeger W, Benet LZ y Bornheim LM (1996) Inhibition of cyclosporine and tetrahydrocannabinol metabolism by cannabidiol in mouse and human microsomes. *Xenobiotica*. **26**:275-284.
- Järbe TUC y Mathis DA (1992) Dissociative and discriminative stimulus functions of cannabinoids/cannabimimetics. en *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Bartke A, Murphy LL, Eds., Biochemistry and physiology os substance abuse, vol IV, CRC Press, Boca Ratón, FL., pgs 459-524.
- Karniol IG y Carlini EA (1973) Pharmacological interaction between cannabidiol and δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*. **33**: 53-70.
- Koehler B (1946) Hemp seed treatments in relation to different dosages and conditions of storage *Phytopathology*. **36**:937-42.
- Lee ML, Novotny M y Bartle KD (1976) Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance spectrometric studies of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in tobacco and marihuana smoke condensates. *Anal. Chem.* **48**:405-16.
- Matsunaga T, Iwawaki Y, Watanabe K, Yamamoto I, Kageyama T y Yoshimura (1995) Metabolism of δ^9 -tetrahydrocannabinol by cytochrome P-450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sci*. **56**:2089-95.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R y Feldmann M (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:9561-9566.
- Mechoulam R, Devane WA y Glaser R (1992) Cannabinoid geometry and biological activity. en *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*, Bartke A, Murphy LL y Eds., Biochemistry and physiology os substance abuse, vol IV, CRC Press, Boca Ratón, FL. 1-34.
- Murphy LL, Steger RW, Smith MS y Bartke A (1990) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol, alone and in combinations on luteinizing hormone and prolactin release and on hypothalamic neurotransmitters in the male rat. *Neuroendocrinology*. **52**:316-321.
- Razdan RK (1986) Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* **38**:75-149.

- Srivastava MD, Srivastava BI y Brouhard B (1998) Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*. **40**:179-185.
- Turner CE, Elsohly MA y Boeren EG (1989) Constituent of Cannabis Sativa L. A review of the natural constituent. *J. Nat. Prod.* **43**:169-234.
- Watanabe K, Kayano Y, Matsunaga T, Yamamoto I y Yoshimura H (1996) Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol. Pharm. Bull.* **19**:1109-1111.
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E y Karniol IG (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta-9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology*. **76**:245-250.

Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno

2

F. Berrendero

2.1. Introducción

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en una resina secretada a partir de las hojas y brotes florecidos de la planta *Cannabis sativa*. Los preparados obtenidos a partir de la planta, como el hachís y la marihuana, se encuentran entre las drogas de abuso más consumidas en el mundo. La planta *Cannabis sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes de los que unos 60 se consideran dentro del grupo de los cannabinoides (Dewey, 1986). El principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta es el Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), compuesto que fue aislado a partir de la misma en el año 1964 por Gaoni y Mechoulam. Dada la elevada liposolubilidad tanto del Δ^9 -THC como de otros cannabinoides naturales, durante mucho tiempo se pensó que estos compuestos ejercían sus efectos mediante interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Sin embargo, estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron mecanismos mediados por receptor como los responsables de los efectos ejercidos por los cannabinoides. Hasta el momento se han clonado dos receptores para cannabinoides: el receptor CB₁ (Matsuda y cols., 1990), densamente expresado en el sistema nervioso central, y el receptor CB₂ (Munro y cols., 1993), localizado fundamentalmente a nivel del sistema inmune. La identificación, caracterización farmacológica y localización de receptores específicos de membrana que mediaban los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides llevó a los investigadores a emprender la búsqueda de ligandos endógenos que activaran estos receptores. De esta manera, a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo se aisló la anandamida (Devane y cols., 1992), el primer endocannabinoide conocido que resultó ser una amida de un ácido graso poliinsaturado, concretamente del ácido araquidónico. Posteriormente, a partir de intestino de perro y cerebro de rata se aisló otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura

y cols., 1995). Todas estas observaciones han proporcionado una clara evidencia acerca de la existencia de un sistema cannabinoide endógeno cuyo papel fisiológico está siendo investigado en la actualidad. No obstante, sobre la base de la localización de los receptores de cannabinoides en el organismo (Herkenham y cols., 1990; Maillieux y Vanderhaeghen, 1992) y de los efectos farmacológicos ejercidos por distintos cannabinoides tanto de origen natural como sintético (Pertwee, 1997), este sistema parece estar implicado en funciones tales como la coordinación motora, el aprendizaje y la memoria, la antinociación, el control de las emociones, el desarrollo neuronal así como en la mediación de diferentes procesos a nivel cardiovascular e inmunológico.

2.2. Receptores de cannabinoides

Como se ha indicado en la Introducción de este capítulo, los cannabinoides ejercen sus efectos farmacológicos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento se han identificado dos receptores para cannabinoides: el receptor CB₁ y el receptor CB₂. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana. También se ha descrito la existencia de una variante del receptor CB₁, denominado CB_{1A}, resultante de un "splicing" alternativo que posee un modelo de distribución muy similar al del receptor CB₁ (Shire y cols., 1995).

2.2.1. Distribución de los receptores de cannabinoides

El receptor CB₁ se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central. Mediante la aplicación de diferentes técnicas autorradiográficas y de estudios inmunohistoquímicos se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham y cols., 1990; Maillieux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998). De esta forma, la mayor densidad de receptor CB₁ se encuentra en los ganglios basales (sustancia nigra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), capa molecular del cerebelo y ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado). La densidad de este receptor es más moderada en las capas I y IV de la corteza cerebral, mientras que un escaso número de receptores se encuentra en el hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal (figura 2.1). Además de su localización en cerebro, los receptores CB₁ también están presentes a nivel periférico. De esta forma, se han encontrado receptores CB₁ en el bazo y las amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosos simpáticos (Galiegue y cols., 1995; Ishac y cols., 1996).

En general, la distribución de los receptores CB₁ se encuentra en estrecha relación con bastantes de los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides. Así, la alta densidad de receptores en los ganglios basales se relaciona con los marcados efectos que estos compuestos ejercen sobre la

actividad locomotora de los roedores, llegando a producir catalepsia a dosis elevadas (Little *y cols.*, 1988). La presencia de receptores CB₁ en áreas hipocampales y corticales explicaría los efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria así como las propiedades anticonvulsivantes de los mismos. Finalmente, la baja densidad de receptores en el tallo cerebral, área que controla las funciones cardiovascular y respiratoria, explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana.

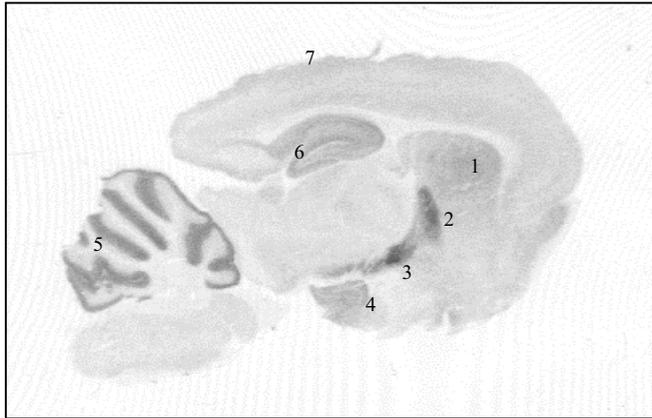


Figura 2.1. Corte sagital de cerebro de rata adulta que muestra la distribución de receptores CB₁ (1, caudado-putamen; 2, globo pálido; 3, núcleo entopeduncular; 4, sustancia nigra; 5, cerebelo; 6, hipocampo; 7, corteza cerebral).

La distribución de los receptores CB₂ es marcadamente diferente a la de los CB₁. Los receptores CB₂ se localizan fundamentalmente en bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmune (linfocitos B, aunque también en monocitos y linfocitos T) (Gallegue *y cols.*, 1995; Schatz *y cols.*, 1997). Los receptores CB₂ presentes en estos tejidos y células parecen ser los responsables de las propiedades inmunosupresoras de la marihuana (Klein *y cols.*, 1998).

2.2.2. Mecanismos de transducción de señales

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores de cannabinoides CB₁ incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la vía de las MAP quinasas (Howlett, 1998). El acoplamiento de estos receptores a proteínas G_{i/o} constituye la base de todos estos efectos. La activación de los receptores CB₁ produce una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa lo que da lugar a un descenso en los niveles de AMPc intracelular. De esta forma se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de este nucleótido cíclico, lo que dadas las funciones que estas quinasas ejercen sobre el metabolismo celular o la expresión génica conducirá a determinados efectos biológicos. La activación de los receptores de cannabinoides también

induce una inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q y un aumento de la conductancia del K^+ . El efecto combinado sobre ambos tipos de canales parece ser la base de la inhibición que los cannabinoides ejercen en la liberación de neurotransmisores. Finalmente, los cannabinoides también activan la ruta de las MAP quinasas, vía involucrada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación (Bouaboula *y cols.*, 1995).

En cuanto al receptor CB_2 , su activación también conduce a una inhibición de la adenilato ciclasa y activación de la vía de las MAP quinasas. Sin embargo, a diferencia del CB_1 , el receptor CB_2 no es capaz de modificar las corrientes de los canales de Ca^{2+} y K^+ (Felder *y cols.*, 1995).

2.2.3. Ligandos de los receptores de cannabinoides

Como se ha señalado con anterioridad, el Δ^9 -THC es el principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta *Cannabis sativa*. Además del Δ^9 -THC, otros cannabinoides como el Δ^8 -THC, el cannabinal y el cannabidiol también están presentes en la planta. A partir de la estructura química de estos cannabinoides naturales se han desarrollado una serie de cannabinoides sintéticos que han resultado muy importantes para avanzar en el conocimiento de la farmacología de estos compuestos (Pertwee, 2000). Así, dentro de los agonistas de los receptores de cannabinoides destacan, entre otros, análogos bicíclicos como el CP55,940 y derivados de aminoalquilindoles como el WIN55,212-2. Otro grupo de agonistas, como es el formado por los cannabinoides endógenos, será comentado en el siguiente apartado (figura 2.2). El desarrollo de antagonistas específicos para los receptores de cannabinoides ha sido también de vital importancia para la investigación en este campo. Dentro de este grupo de compuestos destacan el SR141716A (Rinaldi-Carmona *y cols.*, 1994), y el SR144528 (Rinaldi-Carmona *y cols.*, 1998), antagonistas específicos de los receptores CB_1 y CB_2 , respectivamente.

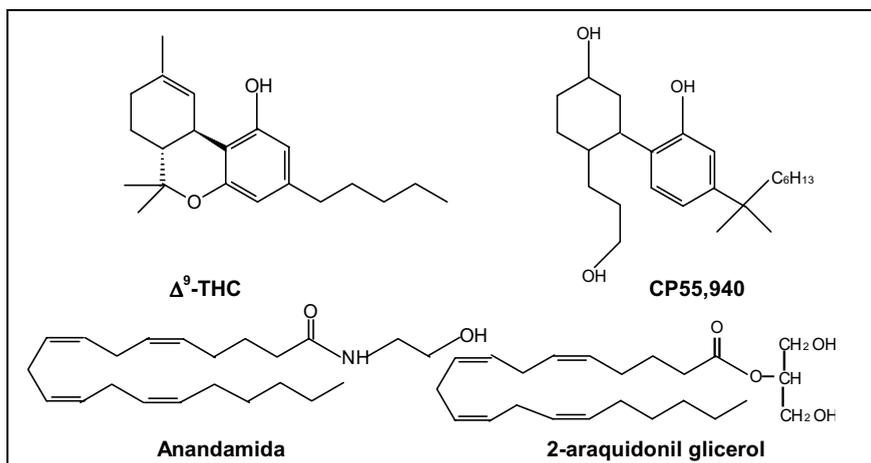


Figura 2.2. Estructura química de algunos cannabinoides representativos.

2.3. Endocannabinoides

Los ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como anandamida (Devane *y cols.*, 1992) y el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam *y cols.*, 1995; Sugiura *y cols.*, 1995). Otro miembro de esta familia de lípidos, la palmitoiletanolamida, comparte con los cannabinoides endógenos diversos efectos fisiológicos aunque no es capaz de unirse a ninguno de los dos subtipos de receptores de cannabinoides conocidos hasta el momento (Sugiura *y cols.*, 2000). Recientemente se ha aislado un nuevo endocannabinoide a partir de cerebro porcino, el 2-araquidonil gliceril éter (Hanus *y cols.*, 2001).

2.3.1. Localización y características farmacológicas de los endocannabinoides

Las concentraciones de anandamida en el cerebro son muy bajas ya que, como se detallará en el siguiente apartado, este endocannabinoide no es almacenado en las células en su forma biológicamente activa sino que es sintetizado en respuesta a un determinado estímulo a partir de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular. En general, dentro del cerebro los niveles más altos de anandamida se corresponden con áreas que también presentan una elevada densidad de receptores de cannabinoides tales como el hipocampo, la corteza, o el estriado (Felder *y cols.*, 1996). Esta correlación no es completa ya que otras áreas como el tálamo o el tallo cerebral poseen pocos receptores y un alto nivel del endocannabinoide (Felder *y cols.*, 1996; Bisogno *y cols.*, 1999). Las concentraciones que se alcanzan en el cerebro de 2-araquidonil glicerol son mucho mayores que las de anandamida (Stella *y cols.*, 1997), aunque en general hay una buena correlación entre los dos endocannabinoides en las distintas áreas cerebrales en las que estos compuestos han sido analizados (Bisogno *y cols.*, 1999). La anandamida es capaz de unirse a los receptores CB₁ y CB₂ aunque muestra una mayor afinidad por los CB₁ (Felder *y cols.*, 1995). A pesar de que la anandamida comparte con el Δ^9 -THC así como con otros cannabinoides la mayoría de sus propiedades farmacológicas tanto en sistema nervioso central como a nivel periférico, existen diversos efectos ejercidos por este endocannabinoide que no son mediados por los receptores de cannabinoides conocidos hasta el momento. De hecho, otros receptores diferentes a los de cannabinoides, como son los receptores de vanilloides de tipo 1 (VR1), pueden ser activados también por la anandamida y mediar alguno de los efectos de la misma (Zygmunt *y cols.*, 1999).

2.3.2. Biosíntesis y metabolismo de los endocannabinoides

Los endocannabinoides cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor ya que son sintetizados y liberados a partir de las neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula.

Únicamente, a diferencia de lo que ocurre en el caso de otros neurotransmisores y dada la naturaleza lipofílica de estos compuestos, los endocannabinoides no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas. La síntesis de anandamida, que es el cannabinoide endógeno más estudiado hasta la fecha, se produce mediante la hidrólisis, catalizada por una fosfolipasa D, de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, el N-araquidonilfosfatidiletanolamina (Di Marzo *y cols.*, 1994). Este compuesto sirve como depósito de almacenaje para la anandamida que va a ser sintetizada y liberada en el momento en que exista una necesidad de la misma. La vida media de la anandamida es muy corta ya que es rápidamente recaptada por un transportador de alta afinidad, aún no caracterizado molecularmente, que está presente tanto en neuronas como en células gliales (Hillard *y cols.*, 1997; Beltramo *y cols.*, 1997). Una vez que la anandamida se encuentra en el interior de la célula es degradada por la acción de una amido-hidrolasa que cataliza la hidrólisis de este endocannabinoide dando lugar a sus dos componentes fundamentales: ácido araquidónico y etanolamina (Di Marzo *y cols.*, 1998). Recientemente se han desarrollado una serie de compuestos de gran interés, tanto desde el punto de vista de su uso en investigación como por sus posibles aplicaciones clínicas, capaces de potenciar el tono cannabinoide endógeno al actuar sobre algunas moléculas diana de este sistema. Ejemplos de los mismos son el AM404 (Beltramo *y cols.*, 1997), o el AM374 (Gifford *y cols.*, 1999), inhibidores del transportador que media la recaptación de anandamida y de la amido-hidrolasa que degrada este mismo endocannabinoide, respectivamente.

La ruta de síntesis más probable para el 2-araquidonil glicerol implica la actuación de una diacilglicerol lipasa que convierte el diacilglicerol en este endocannabinoide (Stella *y cols.*, 1997). Tras su liberación, el 2-araquidonil glicerol puede ser recaptado por el transportador de anandamida (Piomelli *y cols.*, 1999) y posteriormente degradado por la actuación de una monoacilglicerol lipasa, enzima que ha sido identificada en tejidos cerebrales (Stella *y cols.*, 1997).

2.4. Posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides

Como se ha mostrado a lo largo de este capítulo, durante los últimos años la investigación sobre la bioquímica y la farmacología del sistema endocannabinoide ha experimentado un espectacular avance. Este sistema parece jugar un importante papel en la regulación de diferentes funciones fisiológicas por lo que compuestos de naturaleza cannabinoide podrían ser útiles en el tratamiento de alguna de las patologías asociadas con estos procesos. En la actualidad son muchos los estudios que muestran un potencial terapéutico para los cannabinoides en diversas enfermedades. Algunas de ellas son el dolor crónico, el glaucoma, la isquemia cerebral, ciertos tipos de cáncer y enfermedades que cursan con alteraciones del movimiento (Porter y Felder, 2001). Posiblemente en un futuro no demasiado lejano, alguno de los compuestos que actúan sobre el sistema endocannabinoide podrá ser utilizado clínicamente en alguna de estas patologías.

Bibliografía

- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A y Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. **277**:1094-1097.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ y Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**:377-380.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G y Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem. J.* **312**:637-641.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A y Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **258**:1946-1949.
- Dewey WL (1986) Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **38**:151-178.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC y Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. **372**:686-691.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T y De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* **21**:521-528.
- Felder Ch C, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie KP, Blond O, Lai Y, Ma AL y Mitchel RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **48**:443-450.
- Felder Ch C, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM y Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* **393**:231-235.
- Gaoni Y y Mechoulam R (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**:1646-1647.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon S, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G y Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **232**:54-61.
- Gifford AN, Bruneus M, Lin S, Goutopoulos A, Makriyannis A, Volkow ND y Gatley SJ (1999) Potentiation of the action of anandamide on hippocampal slices by the fatty acid amide hydrolase inhibitor, palmitylsulphonyl fluoride (AM 374). *Eur. J. Pharmacol.* **383**:9-14.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I y Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:3662-3665.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR y Richfield EK (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:1932-1936.

- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A y Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* **69**:631-638.
- Howlett AC (1998) The CB₁ cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol. Dis.* **5**:405-416.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME y Kunus G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB₁ receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **118**:2023-2028.
- Klein TW, Friedman H y Specter S (1998) Marijuana, immunity and infection. *J. Neuroimmunol.* **83**:102-115.
- Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS y Martin BR (1988) Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**:1046-1051.
- Mailleux P y Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience.* **48**:655-668.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC y Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* **346**:561-564.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J y Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**:83-90.
- Munro S, Thomas KL y Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* **365**:61-65.
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* **74**:129-180.
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **9**:1553-1571.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie X-Q y Makriyannis A (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:5802-5807.
- Porter AC y Felder ChC (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **90**:45-60.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC y Le Fur G (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **350**:240-244.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millán J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Brelière JC y Le Fur G (1998) SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* **284**:644-650.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT y Kaminski EN (1997) Cannabinoid receptors CB₁ and CB₂: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**:278-287.

- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D y Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **270**:3726-3731.
- Stella N, Schweitzer P y Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* **388**:773-778.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A y Waku K (1995) 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:89-97.
- Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H y Waku K (2000) Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **275**:605-612.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K y Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* **83**:393-411.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D y Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* **400**:452-457.

Farmacología de los receptores para cannabinoides

3

A. Pazos y S. Mato

3.1. Receptores para compuestos cannabinoides. Definición y clasificación

Los productos derivados de la planta *Cannabis sativa* ejercen un amplio espectro de acciones sobre la actividad fisiológica normal, la mayor parte de las cuales son atribuibles al Δ^9 -THC. Entre los efectos asociados al consumo agudo de derivados cannabinoides destacan las acciones sobre la esfera cognitiva y psicológica, incluyendo una marcada sensación de euforia, relajación y sedación. Pero la administración de compuestos cannabinoides se asocia además a la aparición de efectos analgésicos, antieméticos, acciones sobre la actividad muscular, efectos cardiovasculares, neuroendocrinos, inmunomoduladores y antiproliferativos, entre otros. La aparición de una variedad tan amplia de efectos biológicos, junto con el progresivo desarrollo e identificación de moléculas que imitaban o bloqueaban tales respuestas, fue apoyando la hipótesis de que los compuestos cannabinoides podrían actuar en base a la interacción con receptores específicos.

El carácter altamente lipofílico de los cannabinoides naturales dificultó durante muchos años la identificación de receptores específicos para este tipo de sustancias. De hecho, algunos autores atribuían inicialmente los efectos farmacológicos del Δ^9 -THC a su interacción con los componentes de la membrana celular. A pesar de que esta teoría sigue vigente para explicar determinadas propiedades de los compuestos cannabinoides, el desarrollo de análogos sintéticos con mayor potencia y menor carácter lipofílico que el Δ^9 -THC ha permitido establecer que la mayoría de las acciones farmacológicas evocadas por los compuestos cannabinoides se deben a su interacción con, al menos, dos tipos diferentes de proteína receptora, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. El primer receptor caracterizado por métodos radiométricos fue el receptor cannabinoide central o CB₁ (Devane *y cols.*, 1988), cuya estructura molecular fue identificada poco tiempo después en la rata (Matsuda *y cols.*, 1990) y en el ser humano (Gerard *y cols.*, 1991). Las proteínas CB₁ contienen 472-473 aminoácidos organizados

en una secuencia típica, altamente conservada entre las distintas especies estudiadas, y se expresan preferentemente sobre poblaciones neuronales del cerebro de mamíferos (Herkenham *y cols.*, 1991; Glass *y cols.*, 1997), donde se les atribuye un papel importante como moduladores de la liberación de distintos neurotransmisores.

Poco después de la caracterización molecular de los receptores CB₁, Munro *y cols.* (1993) describieron la existencia de un segundo receptor para compuestos cannabinoides que exhibe una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con los receptores CB₁, pero que a diferencia de éstos, no parece expresarse en tejido cerebral. Estos receptores cannabinoides periféricos, denominados CB₂, alcanzan densidades importantes en distintos tipos de células inmunes, y los efectos inmunomoduladores de los compuestos cannabinoides se atribuyen, fundamentalmente, a su interacción con estas proteínas.

Desde el punto de vista molecular, la estructura secundaria de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ comparte los motivos estructurales que definen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, es decir, un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular, y siete dominios transmembrana. Además, ambas proteínas comparten muchas de las características comunes a esta superfamilia de receptores, y que se consideran implicadas en la interacción con agonistas o bien en la transducción y terminación de la señal (residuos específicos como sustratos de fosforilación, lugares de fijación de ligandos y de proteínas G, etc).

En relación con los receptores CB₁, Shire *y cols.* (1995) han señalado la existencia de una variante de *splicing* alternativo del ADN que codifica el receptor CB₁ en el ser humano y en la rata. Esta variante resulta en una isoforma con 61 aminoácidos menos en el extremo amino-terminal, denominada CB_{1A} (actualmente designada CB_{1(b)}), de acuerdo con la normativa de la *International Union of Pharmacological Societies*, o IUPHAR). Según estos autores, la distribución del ARN mensajero que codifica este receptor es similar a la del receptor CB₁, tanto dentro como fuera del sistema nervioso central, si bien su nivel de expresión es mucho menor. Asimismo, los receptores CB_{1(b)} expresados de forma estable exhiben propiedades farmacológicas y transduccionales similares a los CB₁, aunque ligeramente atenuadas. Sin embargo, hasta el momento la proteína CB_{1(b)} no ha sido detectada *in vivo*, por lo que su existencia y posible relevancia funcional siguen estando en tela de juicio.

Por otro lado, ciertas evidencias sugieren actualmente la existencia de receptores cannabinoides cerebrales distintos a CB₁/CB_{1(b)} y CB₂. Por un lado, Skaper *y cols.* (1996) han descrito la presencia del ARN mensajero que codifica el receptor CB₂ en cultivos de células de Purkinje y de células granulares de cerebelo de ratón, así como la existencia de dos sitios de fijación de alta afinidad para el agonista cannabinoide [³H]WIN55,212 en membranas cerebelosas. También se ha sugerido la expresión de un subtipo de receptor cannabinoide distinto a CB₁ y CB₂ en células gliales de corteza en la rata (Berrendero *y cols.*, 1998). En relación con estos datos, se ha sugerido la presencia de sitios de fijación con perfil cannabimimético y distintos a CB₁ y CB₂ en cerebro de ratones en los que se ha generado genéticamente la ausencia de receptores CB₁ (*knock-out*) (Breivogel *y cols.*, 2001).

Sin embargo, la existencia de receptores cannabinoides diferentes a CB₁/CB_{1(b)} en cerebro humano no ha sido confirmada.

Por último, la transducción de señales a través de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ ocurre fundamentalmente a través de su interacción con proteínas G del subtipo G_{i/o}, que conduce, entre otros efectos, a una inhibición del enzima adenililciclase, y a una estimulación de la vía de las quinasas activadas por mitógeno o MAP quinasas, puestas de manifiesto en distintos sistemas (Pertwee, 1997). Además, los receptores cannabinoides CB₁ están acoplados, a través de proteínas G_{i/o}, a canales iónicos de distinto tipo, y esta característica no es compartida por los receptores cannabinoides CB₂. Concretamente, la activación de receptores CB₁ conduce a una regulación negativa de canales de calcio de tipo -N y -P/Q, y positiva de corrientes rectificadoras de potasio (Pertwee, 1997), estando ambos efectos relacionados con la influencia negativa de los agonistas cannabinoides sobre la liberación de distintos neurotransmisores. Los mecanismos a través de los cuales se articula la generación de estas respuestas se abordan en detalle en otros capítulos de esta guía.

3.2. Ligandos cannabinoides

3.2.1. Agonistas

Existe una amplia variedad de moléculas que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides, es decir, activadores de las respuestas mediadas por éstos. Se pueden clasificar en cuatro grupos de compuestos, en función de su estructura química: cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

El grupo de cannabinoides clásicos incluye compuestos con estructura de dibenzopirano, como son los cannabinoides derivados de *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, cannabinoles y cannabidiol), y los análogos sintéticos del Δ^9 -THC, como el 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptilo (HU-210), el 11-hidroxi-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243) y la nabilona. El Δ^9 -THC sintético (dronabinol) y la nabilona han sido utilizados en algunos países con fines clínicos (USA, Reino Unido, Suiza y Canadá). Por último, dentro de esta familia de compuestos cannabimiméticos merece mencionarse el 3-(5'-ciano-1',1'-dimetilpentil)-1-(4-N-morfolinobutiliroxi)- Δ^8 -THC (O-1057), por su carácter hidrosoluble (Pertwee, 2001).

Los cannabinoides no clásicos son análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC que carecen del anillo pirano. El principal representante de este grupo es el CP55,940, cuya forma tritiada se utilizó para demostrar, por primera vez, la presencia de receptores específicos para cannabinoides en cerebro de rata (Devane y cols, 1988). Otros agonistas cannabinoides no clásicos son el CP55,244, CP50,556 (levonantradol) y el desacetilevantradol (DALN).

El tercer grupo de compuestos cannabimiméticos son los aminoalquilindoles, cuyo principal representante es el WIN55,212-2. Esta familia incluye moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina, y difiere bastante de la de los dos grupos de compuestos anteriormente mencionados. En este sentido, y aunque exis-

ten evidencias de que el WIN55,212-2 interacciona con los receptores cannabinoides de manera distinta a como lo hacen los análogos clásicos y no clásicos, se ha descrito que los tres tipos de compuestos son capaces de desplazarse mutuamente de su unión a receptores CB₁ y CB₂ (Pertwee, 2001).

La última familia de moléculas con actividad cannabimimética se ha desarrollado a partir del descubrimiento de la existencia de ligandos cannabinoides endógenos (Devane *y cols.*, 1992). Este grupo incluye una serie de compuestos estructuralmente derivados del ácido araquidónico, cuyo principal representante es la araquidoniletanolamida (anandamida, AEA), considerada el ligando endógeno por excelencia del sistema. Otros componentes de la familia de los eicosanoides son también ligandos cannabinoides endógenos, como la homo- γ -linoleniletanolamida, la 7,10,13,16-docosatetraeniletanolamida, el 2-araquidonilglicerol (2-AG), y el recientemente descubierto 2-araquidonilgliceril éter (noladin éter). Estos compuestos cannabinoides endógenos se caracterizan por su alta sensibilidad a la hidrólisis enzimática a cargo de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), y por este motivo, muchos de los ensayos *in vitro* realizados con compuestos endocannabinoides incluyen un inhibidor de esta actividad enzimática como el fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF). En el grupo de los eicosanoides se incluyen asimismo, derivados sintéticos más estables a la hidrólisis enzimática que los cannabinoides endógenos, como son la (R)-(+)-araquidonil-1'-hidroxi-2'-propilamida (metanandamida), la araquidonil-(2'-fluoroetil)amida (O-585) y la 2-metilaraquidonil-(2'-fluoroetil)amida (O-689). Los últimos representantes de este grupo son los compuestos cannabimiméticos con mayor selectividad CB₁ sintetizados hasta el momento, la araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonilciclopropilamida (ACPA). Ambos se comportan como potentes agonistas CB₁ de alta eficacia (Pertwee *y cols.*, 2001).

TABLA 3.1

Características farmacológicas de los principales agonistas cannabinoides (modificado de Pertwee, 2001).

	Afinidad (K _i , nM) *		Eficacia relativa	
	CB ₁	CB ₂	CB ₁	CB ₂
ACEA	1,4	> 2000	+++++	—
ACPA	2,2	715	++++	—
2-AG	58,3	145	++++	++
2-AG	13,9***	58***	++++	++
Anandamida	89**	371**	++++	+
CP55,940	0,58	0,69	+++++	+++++
HU-210	0,06	0,52	+++++	+++++
Metanandamida	18	868	++++	—
Δ^9 -THC	40,7	36,4	+++	+
WIN55,212-2	1,89	0,28	+++++	+++++

*Valores bajos de K_i son indicativos de una elevada afinidad por el receptor. **En presencia de PMSF. *** En presencia de inhibidores de la hidrólisis enzimática de 2-AG.

Varios de los agonistas cannabinoides citados han sido marcados radiactivamente, y empleados en ensayos de localización y cuantificación de los receptores CB₁ en sistemas de expresión homóloga y heteróloga. Entre estos compuestos, los más ampliamente utilizados para marcar los receptores CB₁ en membranas y secciones cerebrales son el [³H]HU-243, el [³H]WIN55,212-2, y sobre todo, el [³H]CP55,940 (Pertwee, 1997).

En cuanto a la capacidad de interacción de los compuestos cannabimiméticos más frecuentemente utilizados con los receptores cannabinoides, el (-)-Δ⁹-THC se une con afinidad similar a los receptores CB₁ y CB₂, funcionando como agonista parcial en ambos casos. Sin embargo, su eficacia es mayor en la interacción con los receptores CB₁, llegando incluso a comportarse como un antagonista en determinados sistemas CB₂. El CP55,940 y el WIN55,212-2 muestran afinidades por los receptores CB₁ y CB₂ en el rango nanomolar, y su eficacia es relativamente alta. El CP55,940 exhibe una afinidad esencialmente similar por los receptores CB₁ y CB₂, mientras que el WIN55,212-2 muestra una ligera selectividad CB₂. La AEA, en cambio, presenta una cierta selectividad CB₁, y se comporta como un agonista parcial de ambos subtipos de receptores, siendo su eficacia mayor en la interacción con los receptores CB₁. Por último, el HU-210 y el HU-243 son potentes agonistas cannabinoides clásicos, cuya eficacia es similar a la de CP55,940 y WIN55,212-2, siendo su afinidad por ambos subtipos de receptores cannabinoides superior a la de estos compuestos.

3.2.2. Antagonistas

En los últimos años se han desarrollado varias moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos cannabimiméticos mediados por los receptores CB₁ o CB₂, que han supuesto una herramienta fundamental para la caracterización farmacológica de estas proteínas. Entre estos compuestos, la molécula más potente y más ampliamente utilizada como antagonista de los receptores cannabinoides CB₁ es el SR141716A (Rinaldi-Carmona *y cols.*, 1994). Este compuesto exhibe una marcada selectividad por los receptores CB₁ frente a los CB₂, y frente a otros tipos de receptores para neurotransmisores, de forma que es capaz de prevenir y/o revertir las acciones de los agonistas cannabinoides que actúan a través de CB₁ tanto *in vitro*, como *in vivo* (Pertwee, 1997). Algunos autores han puesto de manifiesto que el SR141716A revierte los efectos de la AEA con menor potencia que los de otros agonistas cannabinoides en determinados sistemas *in vitro*, y también se ha sugerido que este antagonista cannabinoide no es capaz de bloquear algunos efectos farmacológicos de la AEA en ensayos *in vivo*, a concentraciones que revierten totalmente las acciones de otros agonistas. En los sistemas *in vivo*, esta discrepancia se ha atribuido a la capacidad de la AEA para activar receptores vanilloides, además de receptores cannabinoides (Smart *y cols.*, 2000).

A partir de la estructura del SR141716A se han desarrollado moléculas como el AM-251 y el AM-281, que también antagonizan de forma selectiva efectos cannabimiméticos derivados de la activación de receptores CB₁. Existen además antagonistas competitivos de los receptores CB₁ que difieren estructuralmente del SR141716A, como es el caso del LY320135. Finalmente, el metilaraquidonilfluo-

rofosfonato (MAFP) es un potente inhibidor irreversible de la degradación enzimática de cannabinoides endógenos por la FAAH, que también se comporta como un antagonista irreversible de los receptores CB₁ (Pertwee 2001).

En relación con los receptores cannabinoides CB₂, la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo de estas proteínas es el SR144528 (Rinaldi-Carmona *y cols.*, 1998). Otros fármacos utilizados como antagonistas cannabinoides selectivos para los receptores CB₂ son la 6-iodopravadolina (AM-630) y el cannabinoide clásico 6'-azidohept-2'-ino- Δ^8 -THC (O-1184).

TABLA 3.2

Características farmacológicas de los principales antagonistas/agonistas inversos/agonistas parciales de los receptores cannabinoides (modificado de Pertwee, 2001).

	Afinidad (K _i , nM)		Clasificación	
	CB ₁	CB ₂	CB ₁	CB ₂
AM-281	12	4200	A/I	—
AM-630	5152	31,2	—	A/I
LY320135	141	14900	A/I	—
MAFP	20	—	A	—
O-1184	5,2	7,4	A/P	A/I
SR141716A	5,6	>1000	A/I	—
SR144528	437	0,6	—	A/(I?)

A, antagonista competitivo; I, agonista inverso; P, agonista parcial.

Además de su habilidad para prevenir o atenuar acciones cannabimiméticas, algunas de estas moléculas desarrolladas como antagonistas de los receptores CB₁ o CB₂ son capaces, por sí solas, de provocar efectos contrarios a los evocados por agonistas cannabinoides. Tradicionalmente, esta propiedad de los fármacos antagonistas se ha atribuido a un bloqueo del tono endógeno, aunque actualmente distintos trabajos sugieren que varios de estos compuestos cannabinoides se comportan como agonistas inversos en algunos sistemas, reduciendo la actividad constitutiva de los receptores cannabinoides. La molécula para la que se han descrito y estudiado en mayor detalle respuestas como agonista inverso de los receptores cannabinoides es el SR141716A (Pertwee, 2001). Otros compuestos que también han demostrado cierta capacidad como agonistas inversos son el AM-281 y el LY320135 en relación con los receptores, y el SR144528, el AM-630 y el O-1184, en el caso de sistemas CB₂.

3.3. Respuestas fisiológicas y perspectivas terapéuticas generales

El análisis detallado de los efectos fisiológicos -y, por tanto, también de los farmacológicos- de los derivados cannabinoides se analiza con detalle en otros

capítulos de esta guía. De forma muy resumida, el estímulo de receptores cannabinoides puede dar lugar a las siguientes respuestas:

- Sensación de euforia, sedación y relajación.
- Alteraciones de la percepción temporal (sobreestimación del tiempo transcurrido) y de la memoria reciente.
- Actividad analgésica y antiinflamatoria.
- Actividad orexígena y antiemética.
- Acciones sobre el tono muscular y la coordinación motora (ataxia, debilidad muscular).
- Disminución de la presión intraocular.
- Hipotermia.
- Acciones sobre el aparato respiratorio (broncodilatación).
- Efectos cardiovasculares (hipotensión y taquicardia).
- Efectos neuroendocrinos (disminución en la liberación de distintas hormonas sexuales, e incrementos en la liberación de hormonas relacionadas con la respuesta al estrés).
- Efectos inmunomoduladores (inmunoestimulación a dosis bajas e inmunosupresión a dosis altas).
- Efectos antiproliferativos.

Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las acciones evocadas por los agonistas cannabinoides sobre el sistema nervioso central parecen depender principalmente de la activación de receptores CB₁: efectos cognitivos y psicológicos, antieméticos y analgésicos, aunque en alguno de ellos no puede descartarse la participación CB₂. En cambio, el papel de los receptores CB₂ es fundamental en otras acciones cannabimiméticas, como es el caso de los efectos inmunomoduladores y antiproliferativos.

La amplia variedad de acciones biológicas asociadas al sistema cannabinoide está abriendo la posibilidad de desarrollar compuestos farmacológicamente activos sobre estos receptores, que puedan ser útiles en el tratamiento de diversas patologías. Aunque la perspectiva real de éxito de estas aproximaciones dependerá finalmente de la valoración objetiva de la relaciones beneficio/riesgo (utilidad terapéutica frente a posibles reacciones adversas, sobre todo psicológicas), a continuación se repasa muy brevemente el estado actual de este tema.

Desde el punto de vista de modulación farmacológica, existen dos posibilidades: potenciación o bloqueo de los efectos asociados a los ligandos endógenos. La primera aproximación pasa fundamentalmente por el desarrollo de agonistas específicos, y también, de inhibidores del enzima FAAH. La segunda aproximación, más reciente en el tiempo, supone el desarrollo de fármacos antagonistas. En apartados anteriores de este capítulo se han revisado la mayor parte de las moléculas de estos grupos.

Para el estímulo o agonismo cannabinoide se han propuesto diversas dianas terapéuticas, especialmente enfocadas al tratamiento del dolor (analgesia), de procesos que cursan con náuseas y vómitos, de patología motora espástica -incluyendo enfermedades neurodegenerativas, como la corea de Huntington o la esclerosis múltiple-

del glaucoma, el asma bronquial y, más recientemente, de procesos cancerosos, hecho que ha suscitado un alto grado de interés. Como se ha comentado previamente, la constatación real del grado de eficacia y seguridad de los agonistas cannabinoides en estas patologías requiere que puedan llevarse a cabo ensayos clínicos de forma estricta y controlada. También es necesario evitar la tentación de mezclar en el mismo debate la cuestión del uso médico de los cannabinoides con la de su despenalización o no para fines recreacionales. A la vista de los escasos datos clínicos existentes hasta el momento, y de todas las indicaciones sugeridas, debería valorarse con especial interés la posibilidad de utilizar agonistas cannabinoides, solos o en combinación con otras familias de fármacos, en el tratamiento de los vómitos por quimioterapia (Tramér y cols., 2001) y de ciertos cuadros de dolor crónico (Campbell y cols., 2001): estos dos usos pueden ser de especial relevancia en las unidades de cuidados paliativos. Y debe mantenerse una clara atención sobre las posibilidades, aún en estadios muy iniciales, de estos fármacos en el tratamiento de ciertos procesos tumorales –los primeros estudios se están centrando en gliomas y astrocitomas– y en los trastornos motores neurodegenerativos.

Por lo que se refiere a las posibilidades del antagonismo cannabinoide, las que se están explorando actualmente se refieren, sobre todo, a su potencialidad antiesquizofrénica y a su posible utilidad en los trastornos del apetito (obesidad), aunque no puede afirmarse que se hayan obtenido hasta ahora resultados clínicos definitivos.

Bibliografía

- Berrendero F, García-Gil L, Hernández M, Romero J, Cebeira M, De Miguel R, Ramos J y Fernández-Ruiz J (1998) Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*. **125**:3179-3188.
- Breivogel C, Griffin G, Di Marzo V y Martin B (2001) Evidence for a new G protein cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **60**:155-163.
- Campbell FA, Tramér MR, Carrol D, Reynolds DJM y Moore RA (2001) Are cannabinoids an effective option in the management of pain? A quantitative systematic review. *BMJ*. **323**:16.
- Devane E, Dysarz F, Johnson R, Melvin L y Howlett A (1988) Determination and characterisation of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **34**:605-613.
- Devane W, Hanus L, Breuer A, Pertwee R, Stevenson L, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A y Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **258**:1946-1949.
- Gerard C, Mollereau C, Vassart G y Parmentier M (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* **279**:129-134.
- Glass M, Dragunow M y Faull R (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. **77**:299-318.
- Herkenham M, Lynn A, Johnson M, Melvin L, De Costa B y Rice K (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *J. Neurosci.* **11**:563-583.

- Matsuda L, Lolait S, Brownstein M, Young A y Bonner T (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. **346**:561-564.
- Munro S, Thomas K y Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. **365**:61-65.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrie P, Breliere J y Le Fur G (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*. **350**:240-244.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC y Le Fur G (1998) SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J. Pharm Exp. Ther.* **284**:644-650.
- Pertwee R (1997) Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* **74**:129-180.
- Pertwee R (2001) Cannabinoid receptor ligands. *Tocris Reviews*. **16**.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D y Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **270**:3726-3731.
- Skaper S, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L y Leon A (1996) The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**:3984-3989.
- Smart D, Gunthorpe M, Jerman J, Nasir S, Gray J, Muir A, Chambers J, Randall A y Davis J (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* **129**:227-230.
- Tramér MR, Carrol D, Campbell FA, Reynolds DJM y Moore RA (2001) Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: a quantitative systematic review. *BMJ*. **323**:1-8.

Mecanismos de transducción de señales de los cannabinoides

4

I. Díaz-Laviada

Como se analizará más adelante en este libro, parece ser que una de las funciones que podrían tener los cannabinoides en el organismo es la de modular la neurotransmisión y a través de este fenómeno ejercer los efectos fisiológicos característicos. De hecho, el receptor central de cannabinoides se expresa fundamentalmente en las neuronas presinápticas. Por lo tanto parece que la producción endógena de cannabinoides es más bien local, es decir, cerca del sitio de acción. En el caso de una administración externa de cannabinoides, bien farmacológica o bien por consumo de marihuana, el principio activo pasa a la sangre y se distribuye por el organismo. Así llega a las células diana, que tienen receptores para cannabinoides. Los cannabinoides, tanto endógenos como exógenos, se unen a los receptores y provocan una respuesta en la célula.

Se llama *mecanismos de transducción de señales* a todos aquellos procesos, reacciones, activaciones, cambios de conformación, por los cuales una molécula que está en el exterior de una célula, provoca una respuesta en el interior de la célula. El primer paso es la unión de la molécula a su receptor pero, ¿cómo comunica el receptor esa unión al interior de la célula?

4.1. Introducción a los mecanismos de transducción

En algunos casos entra la molécula dentro de la célula y se une a receptores intracelulares, pero en la mayoría de los casos el receptor está en la membrana celular esperando la llegada de una molécula determinada, denominada ligando, que se une a él provocando su activación. Se podría decir que hay cuatro prototipos de activación de receptores de membrana:

1. La unión del ligando al receptor provoca la escisión del receptor en fragmentos, de modo que se separan un fragmento extracelular y otro intracelular, que es el que comunica la activación al interior. Es el caso del receptor Notch implicado en el desarrollo (Fortini, 2001).

2. El receptor es un canal por el que entran determinados iones. La unión del ligando al receptor estimula el paso de iones a través del canal, aumentando la concentración de iones en el interior de la célula. Muchos neurotransmisores funcionan a través de este tipo de receptor (algunos revisados recientemente en Choe, 2002; Karlin, 2002).
3. El receptor atraviesa la membrana plasmática y tiene una actividad enzimática en la zona intracelular. La unión del ligando al receptor provoca un cambio en la conformación del receptor por el que se induce la actividad enzimática en el interior celular. Suelen ser receptores de factores de crecimiento y de hormonas (Dupont y LeRoith, 2001).
4. El receptor atraviesa la membrana y está acoplado, por su zona interna, a una enzima intracelular o a un canal, denominados efectores. Al unirse el ligando, el receptor cambia de conformación y esto activa la enzima o el canal, que comunica la activación al interior celular. Generalmente, existe una proteína pequeña que posibilita el acoplamiento entre la zona interna del receptor y el efector, tal y como se representa en la figura 4.1. Esta proteína de acoplamiento suele ser una proteína G, denominada así porque se une a GTP, aunque también hay otros acopladores. Los receptores de cannabinoides descritos hasta el momento pertenecen a este grupo (Axelrod y Felder, 1998).

Una vez activada la señal interior, se produce un segundo fenómeno que continúa transmitiendo la señal, a veces incluso amplificándola. Este fenómeno depende del mecanismo de activación del receptor y puede ser de tres tipos:

1. La introducción de iones positivos supone un cambio de potencial que se transmite por toda la membrana generando un impulso nervioso.
2. Las enzimas que se activan transfieren un grupo fosfato a otras enzimas que a su vez se activan y transfieren otro fosfato a nuevas proteínas formándose una cascada de señales que amplifica y acelera la señal. Estas enzimas se llaman quinasas.
3. Bien por la introducción de iones en el interior de la célula, bien por la activación enzimática, se forman pequeñas moléculas llamadas segundos mensajeros que se unen a otras proteínas que se activan. Estas proteínas suelen ser quinasas o factores de transcripción.

4.2. Acoplamiento del receptor de cannabinoides al efector

4.2.1. Acoplamiento a través de proteínas G

Los receptores de cannabinoides descritos hasta el momento, CB₁ y CB₂, pertenecen a la familia de receptores acoplados a efectores a través de proteínas G. Las proteínas G están formadas por tres tipos de subunidades α , β y γ . La subunidad α une e hidroliza GTP. La unión del agonista al receptor aumenta la afinidad de la subunidad α por GTP. Cuando GTP se une a α produce la disociación de las subunidades $\beta\gamma$. Así se produce la activación de los diferentes efectores bien por la subunidad α , bien por el dímero $\beta\gamma$. La subunidad α unida a GTP se separa del receptor e hidroliza el GTP a GDP, aumentando la afinidad de α por $\beta\gamma$, recompo-

niéndose la proteína G y permitiendo que se inicie un nuevo ciclo de activación. Cada receptor puede activar muchas proteínas G lo que permite una amplificación de la señal.

Hay muchos tipos de proteínas G que se clasifican según la subunidad α . En la mayoría de los tejidos analizados el receptor de cannabinoides se acopla a un efector a través de la proteína G inhibidora $G_{i/o}$, aunque también se ha visto acoplamiento a G_s (Childers y cols., 1993). La proteína $G_{i/o}$ es bloqueada por la toxina de *Bodetella pertussis* y por ello esta toxina se utiliza para demostrar la participación de $G_{i/o}$ en un sistema receptor-acoplador-efector. Se ha comprobado que el receptor de cannabinoides está asociado mediante $G_{i/o}$ a varios efectores.

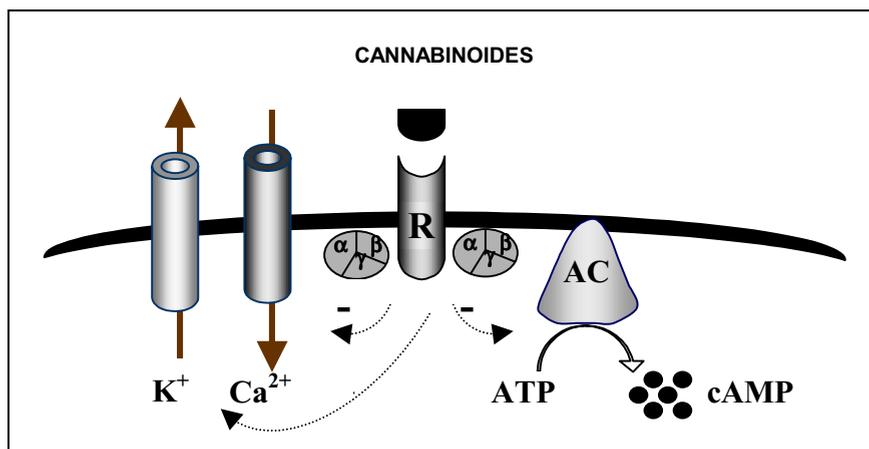


Figura 4.1. Acoplamiento del receptor de cannabinoides a través de proteínas G.

Acoplamiento a través de la subunidad α

En la mayoría de las células se ha visto acoplamiento a la enzima adenilil ciclasa. Esta enzima cataliza la conversión de ATP en AMP cíclico (cAMP) aumentando la cantidad de cAMP en el interior de la célula. El receptor de cannabinoides, a través de la subunidad α de $G_{i/o}$ inhibe la adenilil ciclasa y por lo tanto disminuye el cAMP intracelular y ello constituye una señal de activación de efectos biológicos (Childers y Deadwyler, 1996). En algunos casos el receptor está interaccionando con G_s y estimula la actividad de adenilil ciclasa incrementando los niveles de cAMP intracelulares (Bonhaus y cols., 1998).

Otro de los posibles efectores que puede estar regulando el receptor de cannabinoides a través de proteínas G es la enzima fosfolipasa C. Esta enzima hidroliza uno de los lípidos de la membrana plasmática, el fosfatidil inositol, para escindirlos en dos productos: diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP).

Acoplamiento a través del dímero $\beta\gamma$

El receptor de cannabinoides también puede estar acoplado, a través del dímero $\beta\gamma$ de $G_{i/o}$ a otros efectores como son los canales de calcio sensibles a voltaje

y canales de potasio. Los canales de calcio sensibles a voltaje son proteínas multi-méricas situadas en la membrana celular que se abren cuando hay un cambio de potencial en la membrana, dejando pasar el Ca^{2+} a su través con lo que aumenta la concentración intracelular del calcio. Un aumento intracelular de calcio provoca, en la mayoría de los casos, la expulsión de sustancias de la célula por mecanismos de exocitosis, como ocurre en la liberación de neurotransmisores por la neurona presináptica (Jarvis y Zamponi, 2001). Hay muchos tipos de canales de calcio sensibles a voltaje que se clasifican por criterios farmacológicos. Se ha demostrado que los cannabinoides a través de $\beta\gamma$, inhiben los canales de calcio tipo N- y P/Q- que son los mayoritarios en la neurona presináptica (revisado en Schlicker y Kathmann, 2001). Esto posibilita la modulación de la liberación de neurotransmisores por parte de los cannabinoides, lo que, como se ha mencionado anteriormente, podría explicar muchas de sus acciones biológicas. Por ejemplo, los cannabinoides pueden disminuir la sensación de dolor inhibiendo los canales de calcio que disminuyen la liberación de neurotransmisores.

Además, los cannabinoides también pueden estar acoplados a canales de potasio. Se ha comprobado que el receptor de cannabinoides está acoplado a través de proteínas G a canales de potasio dependientes de voltaje encargados de rectificar la concentración basal de la célula (K_{ir}) (Mackie *y cols.*, 1995) y a canales de potasio activados por proteínas G (GIRK). La unión de los cannabinoides a su receptor activa los canales de potasio que contribuyen a facilitar la salida de potasio de la célula dificultando la restauración del nivel basal. De nuevo vemos como la acción de los cannabinoides es de tipo inhibitoria.

Recientemente se ha demostrado que los cannabinoides pueden inhibir también los canales de calcio de tipo L en la musculatura lisa de arterias, lo que se correlaciona con el papel vasodilatador que puede tener estos compuestos (Revisado en Howlet y Mukhopadhyay, 2000).

No todos los efectos de los cannabinoides son de tipo inhibitorio. Los cannabinoides también podrían ejercer un papel en la célula postsináptica disminuyendo la salida de iones K^+ persistente (corriente de potasio I_M) (Schweitzer, 2000). I_M se opone a la despolarización de la membrana y por lo tanto, las sustancias que disminuyen I_M aumentan la excitabilidad de la membrana.

En muchos casos, los receptores de cannabinoides están cerca de otros receptores celulares, compartiendo los mismos efectores pero distintas proteínas G. Este fenómeno de convergencia de receptores permite que diferentes agonistas produzcan el mismo efecto biológico.

4.2.2. Acoplamiento a través de otras proteínas

En algunos tipos celulares se ha demostrado que el receptor de cannabinoides puede estar acoplado a un sistema efector a través de la proteína FAN (Sánchez *y cols.*, 2001). En este caso el sistema efector es una enzima, la esfingomielinasa neutra, que hidroliza uno de los lípidos de la membrana plasmática, la esfingomielina, para producir ceramidas.

4.3. Cascadas de transducción intracelulares

Como hemos visto, el receptor de cannabinoides pertenece al sistema receptor-acoplador-efector en el que los acopladores son proteínas G o proteína FAN y los efectores son canales de iones o enzimas. Los canales de iones introducen o sacan iones de la célula y esto es una señal en sí misma, generalmente relacionada con la excitabilidad de la célula y con la neurotransmisión. Las enzimas forman nuevas moléculas, llamadas segundos mensajeros, que a su vez activan nuevas enzimas y proteínas formándose lo que se denomina cascada de transducción. Tenemos entonces que tras la activación del receptor de cannabinoides se pueden modificar los siguientes segundos mensajeros:

- AMP cíclico. El cAMP activa una enzima capaz de transferir un grupo fosforilo a otra proteína, llamada proteína quinasa A o PKA.
- Inositoles fosfato y calcio
- Ceramidas

Cada uno de ellos dispara una cascada diferente relacionada con efectos biológicos diferentes. En muchas ocasiones las distintas cascadas se conectan unas con otras entrecruzándose con lo que es muy difícil establecer una determinada ruta y el orden de actuación de los distintos componentes. En la actualidad se está investigando este aspecto que todavía no está muy claro. Aunque muchas de las acciones están mediadas por la inhibición en la producción de cAMP, en la mayoría de los casos no se sabe con exactitud el segundo mensajero implicado. Trataremos de indicar aquí las vías mejor establecidas, teniendo en cuenta que cada tipo celular tiene unas características propias y es muy arriesgado generalizar.

4.3.1. Activación de MAPK

La activación de la cascada de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) por los cannabinoides se ha observado en muchos tipos celulares. Se denomina cascada de MAPK a la activación encadenada de una serie de tres enzimas: una ser/thr quinasa denominada MEKK (*MEK Kinase*), una quinasa dual capaz de fosforilar tanto en ser/thr como en tyr denominada MEK (*MAP-ERK Kinase*) y una ser/thr quinasa llamada MAPK que se activa por MEK cuando es fosforilada tanto en ser/thr como en tyr por MEK (Fig.4.2). En mamíferos hay descritas al menos 4 grupos de cascadas MAPK. Cada grupo se activa en respuesta a distintos estímulos y tiene diferentes funciones biológicas.

La activación de las dos primeras, también llamadas cascadas activadas por señales extracelulares, se suele producir en respuesta a factores de crecimiento y hormonas y están relacionadas con la regulación del crecimiento y diferenciación celular, mientras que las otras dos son activadas por estímulos de estrés y están relacionadas con la regulación de muerte celular (apoptosis), transformación tumoral e inflamación (revisado en Hagemann y Blank, 2001). Los cannabinoides, bien a través de segundos mensajeros como ceramidas, bien a través de las proteínas G, pueden activar tanto la cascada MAPK activada por señales extracelulares como las activadas por estrés y mediante este mecanismo controlar la supervivencia o muerte celular (Guzmán y cols., 2001).

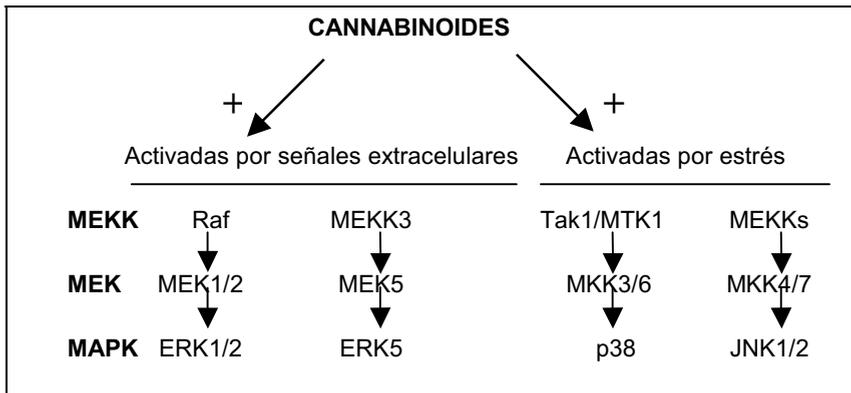


Figura 4.2. Cascadas de MAP quinasas en mamíferos.

4.3.2. PI3K/PKB

Una de las rutas de transducción de señales que interviene en la regulación del crecimiento y del metabolismo celular es la vía de las quinasas PI3K/PDK/PKB. Se ha visto que el receptor de cannabinoides puede activar esta cascada que puede participar en la regulación del metabolismo de la glucosa y del crecimiento celular (Gómez del Pulgar *y cols.*, 2000).

4.3.3. Producción de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que se forma por la acción de una enzima, óxido nítrico sintasa (NOS), y que puede actuar como mensajero de determinadas funciones fisiológicas. La acción del NO depende del entorno celular y de la concentración pero se podría decir que a concentraciones bajas puede actuar como mensajero intercelular, mientras que a elevadas concentraciones tiene efectos perjudiciales a través de la generación de radicales libres. Hay dos tipos de enzimas NOS: la que se expresa constitutivamente en algunas células (cNOS) como neuronas y células endoteliales, y la enzima inducible (iNOS) que se genera en respuesta a determinados estímulos generalmente relacionados con la inflamación. La enzima cNOS produce pequeñas cantidades de NO que puede mediar la relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos actuando como vasodilatador, intervenir en la neurotransmisión como neurotransmisor retrógrado, en la plasticidad sináptica y en la morfogénesis neuronal. Sin embargo la enzima iNOS puede generar NO durante horas o días dando lugar a una gran acumulación de NO que produce un daño oxidativo en la célula. Se ha visto que los cannabinoides aumentan la producción de NO principalmente a través de la activación de cNOS (revisado en Fimiani *y cols.*, 1999; Stefano G.B., 2000). Esto podría explicar algunas de las acciones de los cannabinoides como la vasodilatación que produciría hipotensión, disminución de la función inmunovascular y, de nuevo, inhibición de la liberación de neurotransmisores. En algunos casos se ha observado que los cannabinoides pueden atenuar

nuar la inducción de iNOS ejercida por estímulos inflamatorios lo que podría atribuir un papel antiinflamatorio a estas sustancias.

4.3.4. Fosfolipasa D y fosfolipasas A_2 con producción de ácido araquidónico.

Otra de las posibles vías de actuación de los cannabinoides es la formación de ácido araquidónico (AA). Este ácido graso poliinsaturado puede formarse por la acción de la enzima fosfolipasa A_2 (PLA₂) o de la enzima fosfolipasa D. Ambas pueden ser activadas por los cannabinoides, aunque no en todos los tipos celulares, produciéndose una acumulación de ácido araquidónico (Burstein *y cols.*, 1994). Además PLA₂ puede ser estimulada por otros mecanismos que inducen los cannabinoides como cascada de MAP quinasas, incremento de calcio intracelular o activación de PKC. El ácido araquidónico puede metabolizarse en la célula dando lugar a prostaciclina, tromboxanos e hidroperoxiácidos que tienen sus propias actividades biológicas, amplificándose las posibles acciones fisiológicas de los cannabinoides. El AA puede ejercer también un efecto directo activando enzimas, canales y receptores nucleares.

4.4. Regulación de la expresión de genes

La mayoría de las cascadas de transducción intracelulares desembocan en la producción de proteínas que son factores de transcripción que van al núcleo donde regulan la expresión de determinados genes que darán lugar al aumento en la producción de proteínas responsables del efecto biológico determinado. Los factores de transcripción por tanto, son los maestros que controlan la respuesta celular. En algunos casos el aumento en la expresión de genes es extremadamente rápido y puede ocurrir después de 5 ó 10 minutos de la aplicación del estímulo. A estos genes se les llama genes de estimulación temprana o inmediata. Algunos de estos genes de estimulación inmediata son a su vez factores de transcripción y regulan la expresión de nuevos genes. Hay dos tipos de factores de transcripción: los constitutivos, que están unidos al DNA en ausencia de estímulo y los inducibles, que se activan tras un estímulo celular. Tras la unión de los cannabinoides a su receptor se produce la consiguiente activación o inhibición de cascadas de quinasas que fosforilan y activan o inhiben los factores de transcripción. Uno de los factores constitutivos que resulta modulado por cannabinoides es la familia de factores CREB/ATF (cAMP-Response-Element-Binding protein/Activating-Transcription-Factor) (Herring *y cols.*, 2001). Así se pone en marcha la maquinaria de transcripción con el funcionamiento de los factores de transcripción inducibles. En concreto se ha visto que los cannabinoides pueden activar el factor de transcripción temprano Krox-24 (Bouaboula *y cols.*, 1995) y modular los factores Fos/Jun y NF κ B (revisado en Kaminski, 1998). Sin embargo, dada la cantidad de cascadas de transcripción que se han visto moduladas por los cannabinoides, es evidente que el potencial regulador de los cannabinoides es muy grande y todavía queda mucho por descubrir. Las futuras investigaciones en este campo ayudarán a aclarar los mecanismos de transducción y regulación por los que actúan los cannabinoides.

Bibliografía

- Axelrod J y Felder CC (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonists anandamide. *Neurochemical research*. **23**:575-581.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J y Martin GR (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**:884-888.
- Burstein S, Budrow J, Debatís M, Hunter SA y Subramanian A (1994) Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* **48**:1253-1264.
- Childers SR, Pacheco MA, Bennett BA, Edwards TA, Hampson RE, Mu J y Deadwyler SA (1993) Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochem. Soc. Symp.* **59**:27-50.
- Childers SR y Deadwyler SA (1996) Role of Cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **52**:819-827.
- Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**:115-121.
- Dupont J y LeRoith D (2001) Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm. Res.* **55**:22-26.
- Fimiani C, Liberty T, Aquirre AJ, Amin I, Ali N y Stefano GB (1999) Opiate, cannabinoid and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways: nitric oxide coupling. *Prostaglandins other Lip. Med.* **57**:23-34.
- Fortini ME (2001) Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**:627-634.
- Gómez del Pulgar MT, Velasco G y Guzmán M (2000) The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J.* **347**:369-73.
- Guzmán M, Sánchez C y Galve-Roperh I (2001) Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J. Mol. Med.* **78**:613-625.
- Hagemann C y Blank JL (2001) The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell. Sig.* **13**:863-875.
- Herring AC, Kaplan BLF y Kaminski NE (2001) Modulation of CREB and NF- κ B signal transduction by cannabinol in activated thymocytes. *Cell. Sig.* **13**:241-250.
- Howlett AC y Mukhopadhyay S (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Phys. Lipids* **108**:53-70.
- Jarvis SE y Zamponi GW (2001) Interactions between presynaptic Ca²⁺ channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**:519-525.
- Kaminski NE (1998) Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J. Neuroimmunol.* **83**:124-132.
- Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev. Neurosci.* **3**:102-114.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R y 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**:6552-6561.
- Molina-Holagado F, Molina-Holgado E, Guaza C y Rothwell NJ (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.

- Mu J, Zhuang SY, Hampson RE y Deadwyler SA (2000) Protein kinase-dependent phosphorylation and cannabinoid receptor modulation of potassium A current (IA) in cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch.* **439**:541-546.
- Sánchez C, Rueda D, Ségui B, Galve-Roperh I, Levade T y Guzmán M (2001) The CB₁ cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein Fan. *Mol. Pharmacol.* **59**:955-959.
- Schlicker E y Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**:565-572.
- Schweitzer P (2000) Cannabinoids decrease the K⁺ M-current in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci.* **20**:51-58.
- Stefano GB (2000) Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta Pharmacol. Sin.* **21**:1071-1081.

Procesos de finalización de la señal biológica: sistema de inactivación de los endocannabinoides

5

M.L. López-Rodríguez, A. Viso y S. Ortega-Gutiérrez

5.1. Introducción

Como ocurre con los neurotransmisores clásicos y, en general, con todas las moléculas endógenas que presentan una función neuromoduladora, los endocannabinoides tienen también un sistema específico encargado de su inactivación, es decir, de terminar con las respuestas biológicas inducidas por ellos.

Existen dos mecanismos de terminación básicos, que consisten bien en una retirada del medio de la molécula señalizadora o bien en su degradación enzimática. Además, existe lo que podría considerarse como un tercer mecanismo que sería la acción combinada de los dos anteriores.

Ambos procesos de terminación se encuentran ampliamente extendidos entre los diversos sistemas de neurotransmisores existentes en el organismo y, debido a su importancia fundamental en la regulación de estas vías han sido objeto de especial atención y profundos estudios. Así, un ejemplo clásico de inactivación por retirada del medio de la molécula señalizadora es el proceso de recaptación de las monoaminas neurotransmisoras tales como la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) o las catecolaminas, donde existe una proteína, localizada en la membrana celular, capaz de reconocer de manera específica al neurotransmisor, unirlo y transportarlo al interior celular. Una vez aquí, puede ser degradado, modificado, almacenado en vesículas o aprovechado para la biosíntesis de otros metabolitos, pero, en cualquier caso, ya no será capaz de seguir activando su receptor, que es el sitio de unión extracelular cuyo reconocimiento implica el inicio de un efecto. A esta proteína de membrana que es capaz de transportar al neurotransmisor de una forma específica y selectiva se le denomina transportador. En el caso de las aminas neurotransmisoras (Kuhar *y cols.*, 1999; Frazer y Hensler, 1999), sus transportadores han sido caracterizados molecularmente, lo que significa que se conoce la secuencia de aminoácidos y también la organización y disposición estructural que la cadena proteica adopta en la membrana celular. Así, estos transportadores son

proteínas de membrana constituidas por una cadena polipeptídica de entre 600 y 800 residuos con ambos extremos intracelulares, presentan doce dominios transmembrana y un mecanismo de transporte dependiente de la temperatura y también de iones (Na^+/Cl^- o H^+).

Por otro lado, con respecto al fenómeno de inactivación enzimática, un ejemplo lo constituye la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina catalizada por la enzima acetilcolinesterasa (Taylor y Brown, 1999). Esta enzima, que muestra una elevada capacidad catalítica, se encuentra anclada a la cara externa de la membrana postsináptica y su función es hidrolizar el enlace éster de la acetilcolina, originando acetato y colina e inactivando así el neurotransmisor.

Es decir, que toda molécula con acción neuromoduladora, sea o no considerada neurotransmisor en el sentido más clásico de la palabra, presenta, como una de sus características clave, un sistema específico responsable de su inactivación. En el caso particular de los endocannabinoides, anandamida y 2-araquidonilglicerol, este sistema de terminación consta de dos etapas: una primera etapa de recaptación, mediada por un transportador de membrana (ANT) y una segunda etapa de hidrólisis, catalizada por la enzima intracelular amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*).

5.2. El transportador de endocannabinoides

La estructura altamente hidrofóbica característica de los endocannabinoides hizo que inicialmente se considerara su transporte a través de la membrana celular como un fenómeno pasivo, es decir, que estos ligandos eran capaces de atravesar la bicapa lipídica por simple difusión. Sin embargo, las evidencias experimentales hicieron que pronto esta hipótesis fuera descartada en favor de la existencia de un transporte facilitado mediado por una proteína transportadora (*carrier*). En efecto, si la cinética de la recaptación de anandamida fuera un proceso de difusión simple debería cumplir la ley de Fick, la cual establece que la velocidad de difusión de una molécula es proporcional a su gradiente de concentración a través de la membrana, tratándose pues de procesos cinéticos lineales con el tiempo, no saturables y no competitivos. Sin embargo, las observaciones experimentales indicaban que los endocannabinoides eran capaces de atravesar las membranas a una velocidad mayor de la predicha por la ley de Fick, que su cinética presentaba una tendencia hiperbólica con respecto al tiempo, y que se trataba de un fenómeno que presentaba propiedades de saturabilidad y competitividad, todo ello característico de los fenómenos de transporte facilitados. Además, el descubrimiento y caracterización de otros transportadores de membrana para diferentes derivados de estructura lipídica como diversos ácidos grasos poliinsaturados o prostaglandinas (Schaffer y Lodish, 1994; Kanai *y cols.*, 1995) apoyó la existencia de un mecanismo similar para la anandamida.

5.2.1. Caracterización bioquímica

La existencia de un transportador específico para anandamida fue sugerida por vez primera en 1994 (Di Marzo *y cols.*, 1994) aunque no fue hasta 1997

(Beltramo *y cols.*, 1997; Hillard *y cols.*, 1997) cuando se obtuvieron las primeras evidencias experimentales claras acerca de su presencia. Así, se caracterizó en neuronas y astrocitos un fenómeno de transporte de anandamida que verificaba las principales características de un transporte facilitado. Es decir, se trataba de un transporte rápido, saturable, específico, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio y de ATP (Beltramo *y cols.*, 1997; Hillard *y cols.*, 1997).

La especificidad del transportador, uno de los criterios clave que caracteriza un proceso de transporte facilitado, fue evaluada midiendo la capacidad de otros sustratos estructuralmente relacionados con la anandamida para ser recaptados por este transportador. Sin embargo, ninguna de las moléculas analizadas (diversas *N*-acetilanolaminas, ácido araquidónico y metabolitos derivados, otros icosanoides o incluso derivados hidroxilados de la propia anandamida) era capaz de interactuar apreciablemente con el ANT (Beltramo *y cols.*, 1997; Hillard *y cols.*, 1997; Hillard y Jarrahian, 2000).

La siguiente etapa en la caracterización del transportador consistía en determinar sus condiciones de inhibición. Si es cierto que existe una proteína que media de forma específica el transporte de anandamida a través de la membrana, debe ser posible inhibir esta recaptación mediante el uso de agentes concretos, los cuales, a su vez, además de confirmar la existencia de una proteína con función transportadora de anandamida, servirían para obtener más información sobre la naturaleza de dicho transportador. Así, sucesivos estudios probaron que el ANT era insensible a agentes capaces de inhibir otros transportadores de moléculas de naturaleza lipídica, siendo sensible, sin embargo, a la acción del óxido nítrico (NO) así como de agentes alquilantes. Así, el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), agente alquilante no específico, era capaz de inhibir parcialmente el ANT, mientras que el tratamiento con donadores de NO tales como el nitroprusiato sódico (SNP) producía su estimulación. El efecto de ambos compuestos, SNP y PMSF, parece deberse a su interacción específica con un residuo clave de cisteína situado en el sitio activo del transportador (Maccarrone *y cols.*, 1998), aunque también sería posible postular una interpretación diferente debido al acoplamiento entre los dos componentes del sistema de terminación, ANT y FAAH.

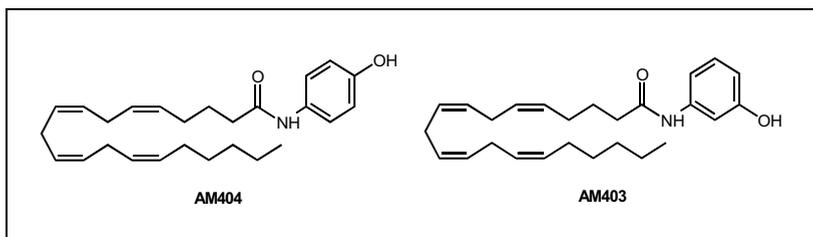


Figura 5.1.

Adicionalmente, la caracterización del AM404 (*N*-(4-hidroxifenil)araquidonamida) como un inhibidor del ANT altamente potente y selectivo, a diferencia de su regioisómero AM403 (Beltramo *y cols.*, 1997), el cual mostraba una potencia inhibitoria diez veces inferior, proporcionó el soporte experimental que faltaba en relación a la capacidad del transportador para discriminar entre moléculas estructuralmente

relacionadas y, por tanto, supuso la evidencia definitiva en apoyo de que la acumulación de anandamida es un proceso altamente específico y mediado por una proteína transportadora.

5.2.2. Distribución tisular

El transporte de endocannabinoides ha sido estudiado y caracterizado en una gran diversidad de líneas celulares y tejidos, tanto centrales como periféricos. Dentro del sistema nervioso central (SNC), el ANT se ha caracterizado en neuronas corticales y cerebelares, en cultivos primarios de astrocitos (Beltramo *y cols.*, 1997; Hillard *y cols.*, 1997) y también en las líneas celulares C6 de glioma de rata (Bisogno *y cols.*, 2001), N18TG2 (Deutsch y Chin, 1993) y CHP100 (Maccarrone *y cols.*, 1998) de neuroblastoma de ratón y humano, respectivamente, así como CCF-STTG1 de astrocitoma humano (Beltramo y Piomelli, 2000a).

En tejidos periféricos, el transportador de anandamida se ha estudiado en células endoteliales (Maccarrone *y cols.*, 2000a) y también en el sistema inmune. Dentro de éste, el ANT ha sido caracterizado en la línea celular leucémica de rata RBL-2H3 (Rakhshan *y cols.*, 2000; Jacobsson y Fowler, 2001) y en la de linfoma humano U937 (Maccarrone *y cols.*, 1998) así como en macrófagos pertenecientes a la línea celular J774 (Bisogno *y cols.*, 1997).

Aunque las propiedades cinéticas y farmacológicas del sistema de recaptación de endocannabinoides son similares en las distintas subpoblaciones celulares, existen ciertas diferencias en los valores de sus parámetros cinéticos. Así, los valores de la constante de Michaelis (K_m) y de la velocidad máxima (V_{max}) difieren en función del tejido considerado. Este cierto grado de variabilidad puede deberse a la existencia de diversos subtipos de transportadores dependiendo de su localización en el organismo.

5.2.3. Inhibidores del transportador de anandamida

Desde que en 1997 fuera descrito por vez primera el AM404 (Beltramo *y cols.*, 1997) y con el fin de esclarecer las características estructurales que rigen la interacción entre el ANT y sus sustratos, durante los últimos años se han llevado a cabo varios estudios de relación estructura-afinidad (SAFIR) analizando los efectos que diversas modificaciones estructurales producen en la capacidad inhibitoria de los compuestos obtenidos (Piomelli *y cols.*, 1999; Jarrahian *y cols.*, 2000; De Petrocellis *y cols.*, 2000; López-Rodríguez *y cols.*, 2001b).

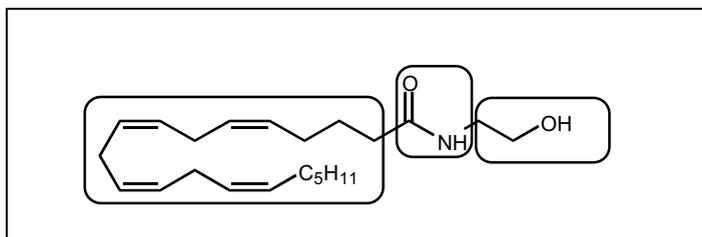


Figura 5.2. Puntos farmacofóricos de la anandamida.

Tanto en la estructura de la anandamida como en la del 2-araquidonilglicerol se han definido tres puntos farmacofóricos potenciales (Figura 5.2): i) la cadena hidrocarbonada, ii) el grupo carboxamido/carboxilato y iii) el grupo polar situado en el extremo de la molécula. Estos puntos han sido objeto de diversas modificaciones estructurales originando nuevos compuestos con diferentes capacidades inhibitorias cuyo análisis ha permitido profundizar en el conocimiento de los requisitos estructurales del transportador (para una revisión reciente véase López-Rodríguez *y cols.*, 2002).

Así, las modificaciones llevadas a cabo en la cadena lateral hidrocarbonada, han puesto de manifiesto que para ser reconocidas por el transportador, las moléculas deben tener al menos una insaturación de estereoquímica *cis* situada en el centro de la cadena. Cadenas laterales completamente saturadas, de once a veinte átomos de carbono, o con insaturaciones *trans* no son reconocidas. Además, existen requerimientos adicionales para permitir la translocación, de modo que sólo compuestos cuya cadena lateral presenta cuatro insaturaciones *cis* son óptimamente transportados al interior celular; moléculas con un menor número de insaturaciones son reconocidas pero no transportadas o son transportadas muy lentamente (Piomelli *y cols.*, 1999). Este hecho ha sido explicado por la existencia de diferencias conformacionales impuestas por la longitud de la cadena y por la estereoquímica y número de dobles enlaces (Piomelli *y cols.*, 1999; Reggio y Traore, 2000).

En relación al grupo amida, su sustitución por los ésteres isómeros correspondientes conduce, en la mayoría de los casos, a compuestos con una capacidad inhibitoria similar (Piomelli *y cols.*, 1999; López-Rodríguez *y cols.*, 2001b). Por otro lado, el efecto de la sustitución en el nitrógeno amídico ha sido también evaluado, observándose que amidas primarias, secundarias e incluso terciarias son capaces de inhibir el transportador, aunque con distinta potencia (Piomelli *y cols.*, 1999).

Por último, las modificaciones realizadas en el extremo polar de la molécula, donde se ha sustituido el fragmento de etanolamina de la anandamida por distintos grupos, incluyendo una enorme variedad de sustituyentes alifáticos, cíclicos, aromáticos y heteroaromáticos, han permitido extraer una serie de conclusiones. Así, entre las consideraciones más relevantes destaca el hecho de que la presencia de un grupo polar en el extremo, aunque no necesariamente dador de enlace de hidrógeno, favorece las interacciones entre el transportador y sus sustratos. Además, el transportador parece tolerar grupos muy voluminosos en esta posición y la presencia de grupos aromáticos contribuye también a aumentar la afinidad por el transportador, probablemente debido a la existencia de apilamientos π - π . Por otro lado, la presencia de grupos electrodonadores en el extremo favorece las interacciones con el transportador, aunque esta interacción es extremadamente sensible a la orientación y posición de dicho grupo, exhibiendo una enorme regioselectividad (Piomelli *y cols.*, 1999; Jarrahian *y cols.*, 2000; López-Rodríguez *y cols.*, 2001b). También se ha evaluado el efecto de la estereoquímica de los compuestos en aquellas moléculas que presentan centros quirales, observándose que los enantiómeros *S* son más potentes que los correspondientes de la serie *R* y que la preferencia enantiomérica es la misma que la mostrada por la FAAH pero contraria a la exhibida por los receptores de cannabinoides (Khanolkar y Makriyannis, 1999; Piomelli *y cols.*, 1999).

Entre la amplia variedad estructural de compuestos cuya capacidad para inhibir el transportador ha sido estudiada, destacan cinco inhibidores que pueden

considerarse como los más representativos. Así, junto con el AM404, merecen especial atención los compuestos VDM11, UCM707, SKM4451 y *N*-(3-piridil)araquidonamida. El AM404 muestra una gran potencia para inhibir la recaptación de anandamida ($CI_{50} = 2,2 \pm 0,2 \mu M$) al mismo tiempo que una relativa selectividad por el transportador, ya que este compuesto no se une a los receptores de cannabinoides ni tampoco inhibe la FAAH (Beltramo *y cols.*, 1997; Piomelli *y cols.*, 1999). Sin embargo, diversos estudios recientes indican que posee una cierta capacidad para activar los receptores de vanilloides VR_1 (De Petrocellis *y cols.*, 2000; Smart y Jerman, 2000; Zygmunt *y cols.*, 2000). El VDM11 ha sido también caracterizado como un potente inhibidor del ANT ($CI_{50} = 10,2 \pm 1,3 \mu M$) carente de afinidad por la FAAH así como de actividad sobre los receptores CB_1 , CB_2 y VR_1 (De Petrocellis *y cols.*, 2000). A su vez, la *N*-(3-piridil)araquidonamida ha demostrado también (Jarrahian *y cols.*, 2000) una elevada capacidad para inhibir la recaptación de anandamida ($CI_{50} = 4,8 \pm 1,1 \mu M$) siendo inactiva sobre el receptor CB_1 aunque no totalmente selectiva con respecto a la FAAH, sobre la que ejerce un cierto efecto inhibitorio ($CI_{50} = 1,2 \mu M$). El SKM4451, además de mostrar unas interesantes características ($CI_{50}(\text{ANT}) = 7,8 \pm 1,3 \mu M$, $CI_{50}(\text{FAAH}) > 10 \mu M$, $K_i(\text{CB}_1) > 3000 \text{ nM}$) tiene la ventaja adicional de presentar fluorescencia, lo que abre un enorme campo de potenciales aplicaciones experimentales (Muthian *y cols.*, 2000). Por último, el recientemente desarrollado UCM707, no sólo representa el inhibidor del transportador más potente desarrollado hasta la fecha ($CI_{50} = 0,8 \pm 0,4 \mu M$) sino que exhibe asimismo una elevada selectividad, puesto que carece de afinidad por los receptores CB_1 y VR_1 y por la enzima FAAH (López-Rodríguez *y cols.*, 2001a; López-Rodríguez *y cols.*, 2001b; López-Rodríguez *y cols.*, 2002). Estas prometedoras características *in vitro* hacen de este compuesto una interesante herramienta farmacológica cuya caracterización *in vivo* ya se ha iniciado.

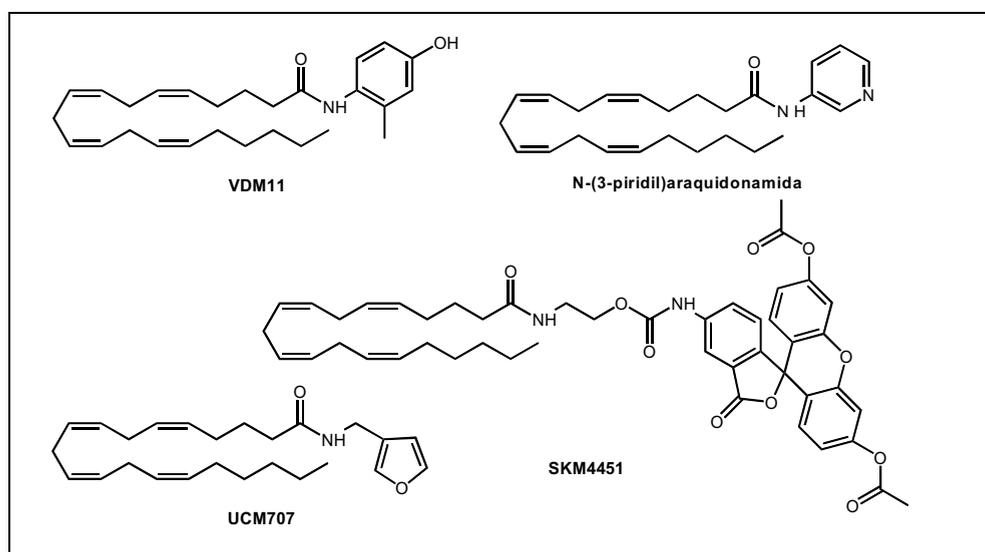


Figura 5.3.

5.3. La enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH)

Una vez que la anandamida ha sido transportada al interior celular puede ser sustrato de la FAAH (EC 3.5.1.4.), enzima intracelular cuya función es hidrolizar el enlace amida dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina y produciendo así la inactivación del endocannabinoide. La FAAH ha sido clonada y secuenciada en diversas especies animales (Cravatt *y cols.*, 1996; Ueda *y cols.*, 2000) y se clasifica como perteneciente a un grupo de enzimas hidrolíticas denominado familia de las amidasas.

5.3.1. Caracterización bioquímica

La primera FAAH de mamíferos fue clonada en 1996 por Cravatt y colaboradores. Ya entonces se describió la estrecha relación observada en su secuencia entre ella y otras amidasas bacterianas previamente conocidas. Esto, junto con la importancia de los efectos fisiológicos atribuidos a sus sustratos, fundamentalmente anandamida y oleamida, impulsó el desarrollo de numerosos estudios destinados a profundizar en el conocimiento de dicha enzima. Así, a lo largo de los últimos años, se han caracterizado FAAH de distintas especies que incluyen la FAAH de rata (Cravatt *y cols.*, 1996), de ratón (Giang y Cravatt, 1997), de cerdo (Goparaju *y cols.*, 1999) y humana (Giang y Cravatt, 1997), se ha estudiado su mecanismo catalítico, su organización genómica y su localización cromosómica y se han desarrollado inhibidores especialmente potentes y selectivos.

Estructuralmente, la FAAH se caracteriza por presentar una secuencia altamente conservada de unos 130 residuos, la denominada secuencia de las amidasas (*amidase signature sequence*). Este dominio es una región con especial abundancia de restos de serina y de glicocola localizada, en el caso particular de la FAAH de rata, entre los residuos 134 y 257 (Patricelli y Cravatt, 2000). Además de este dominio característico, en la estructura de la FAAH se han descrito otros dos dominios de interés. El primero de ellos se localiza en el extremo N terminal de la enzima y su función es de anclaje a membrana, aunque no se descarta la existencia de que otras zonas de la proteína contribuyan asimismo a su asociación a las membranas microsomales y mitocondriales, lugares preferentes de localización de la enzima. Por último, el otro dominio relevante de la FAAH es una región rica en residuos de prolina (aminoácidos 307-315), el cual presenta homología con el dominio de clase II de unión a regiones SH3 representando así una zona de reconocimiento e interacción con otras proteínas.

5.3.2. Distribución tisular

La localización tisular de la FAAH ha sido estudiada exhaustivamente en las distintas especies donde ésta se ha caracterizado, encontrándose que su patrón de distribución difiere en función de la especie considerada. En el caso de la especie humana, la localización preferente se halla en cerebro, páncreas, riñón y músculo esquelético. Su abundancia es menor en el hígado y en el tejido placentario e inexistente en pulmón y corazón. Asimismo, la actividad enzimática también ha sido

objeto de un estudio sistemático, determinándose, en cerebro de rata, qué zonas presentan la mayor capacidad hidrolítica. En general, de estos estudios se desprende que la cantidad de proteína correlaciona con su actividad, es decir, que en las zonas donde hay más concentración de FAAH la actividad enzimática es también mayor. Además se ha encontrado que la presencia de FAAH es paralela a la del receptor CB₁, lo que apoya el hecho de que ambas proteínas formen parte del mismo sistema endógeno (Ueda *y cols.*, 2000).

Respecto a la presencia de la FAAH en células primarias y líneas celulares, ésta se ha descrito, entre otras, en las líneas celulares C6 de glioma de rata, N18TG2 (Deutsch y Chin, 1993) y CHP100 (Maccarrone *y cols.*, 1998) de neuroblastoma de ratón y humano, mientras que no ha sido detectada en la línea celular CCF-STTG1 de astrocitoma humano (Deutsch y Chin, 1993; Piomelli *y cols.*, 1999). En tejidos periféricos, la FAAH se ha localizado en células endoteliales renales de rata (Deutsch *y cols.*, 1997) y también en el sistema inmune, en concreto en la línea celular leucémica de rata RBL-2H3 (Bisogno *y cols.*, 1997) y en la de linfoma humano U937 (Maccarrone *y cols.*, 1998) así como en plaquetas humanas (Maccarrone *y cols.*, 1999) y macrófagos de rata (Di Marzo *y cols.*, 1999).

5.3.3. Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico de la FAAH ha comenzado a esclarecerse de forma inequívoca sólo muy recientemente ya que sólo el desarrollo de experimentos de mutagénesis dirigida ha permitido postular qué residuos concretos dentro del dominio amidasa intervienen en la hidrólisis del sustrato. Así, estos estudios han permitido identificar la serina 241 como el residuo catalítico nucleófilo y la lisina 142 como el catalizador ácido-base, siendo esta diada la responsable del proceso de hidrólisis enzimática. Asimismo, otros residuos cruciales en la actividad amidasa son las serinas 217 y 218 y la arginina 243, mientras que a otros aminoácidos también pertenecientes al dominio amidasa y altamente conservados y que por tanto habían sido inicialmente considerados como potencialmente catalíticos, tales como el aspártico 237 y la asparagina 206, se les ha atribuido una función esencialmente estructural (Patricelli y Cravatt, 2000).

5.3.4. Inhibidores de la FAAH

La importancia de la FAAH en la regulación de importantes procesos fisiológicos ha hecho de la obtención de inhibidores uno de los objetivos prioritarios de numerosos grupos de investigación. Los inhibidores de la enzima pueden clasificarse en dos grandes grupos dependiendo de la reversibilidad de la inhibición. Así, cabe hablar de inhibidores reversibles que son aquellos cuyo diseño se ha basado en la estrategia de mimetizar el estado de transición que se produce en la interacción enzima-sustrato y dentro de los cuales se pueden distinguir tres clases estructurales de inhibidores, las trifluorometilcetonas, los α -cetoésteres y las α -cetoamidas. Por otro lado, la segunda gran clase de inhibidores la constituyen los denominados irreversibles los cuales se unen covalentemente a un residuo crucial para la actividad enzimática impidiendo, por tanto, su acción de una forma definitiva. Dentro de éstos destacan los fluoruros de sulfonilo tales como

el inhibidor inespecífico PMSF o, los que revisten mayor interés debido a que además de mostrar una mayor potencia para inhibir la FAAH son altamente específicos y selectivos de dicha enzima, los fluoruros de palmitil- y estearilsulfonilo (AM374 y AM381, respectivamente). Estos compuestos, con unas CI_{50} de 7 y 4 nM, representan los inhibidores más potentes desarrollados hasta la fecha, potencia que además se presenta acompañada de selectividad frente a los receptores de cannabinoides, por los que muestran una baja afinidad dentro del rango micromolar (Pertwee, 2000).

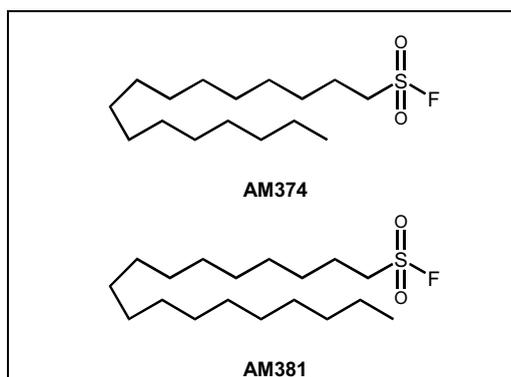


Figura 5.4.

5.4. Relación funcional entre el ANT y la FAAH

La existencia de acoplamiento entre la activación de la FAAH y el funcionamiento del ANT ha sido puesta de manifiesto recientemente por diversos estudios. Así, se ha descrito como, en cerebro humano, la unión de anandamida al receptor CB_1 podría estimular la producción de NO, compuesto que a su vez activaría el ANT aumentando así la presencia de sustrato para la propia FAAH (Maccarrone *y cols.*, 1998; Maccarrone *y cols.*, 2000a).

Esta reciente descripción del acoplamiento entre los procesos de recaptación de anandamida y su hidrólisis subsiguiente por la FAAH hace surgir alguna duda en la interpretación de los resultados obtenidos al inhibir el ANT por tratamiento con PMSF, los cuales permitieron postular la presencia de un residuo de cisteína en el centro activo del transportador. Así, puesto que el PMSF es un inhibidor de la FAAH, el efecto producido por el PMSF en el transportador podría deberse realmente a una inactivación directa de éste o bien a un efecto indirecto, consecuencia de la capacidad inhibitoria del PMSF sobre la FAAH (Deutsch *y cols.*, 2001).

5.5. Aplicabilidad terapéutica de los inhibidores del ANT y de la FAAH

A pesar del enorme potencial terapéutico que el sistema cannabinoide endógeno (SCE) representa para el tratamiento de numerosas patologías, su principal desventaja continua siendo la producción de efectos psicotrópicos asociados a una estimulación de los receptores cerebrales CB_1 . Debido a esto, la utilización de compuestos capaces de

inhibir el sistema de inactivación de los ligandos endógenos, esto es, inhibidores del ANT y de la FAAH, representa una atractiva alternativa a la utilización de agonistas cannabinoides. Estos inhibidores, también denominados agonistas indirectos, serían capaces de reforzar la transmisión endocannabinoide en aquellas circunstancias patológicas caracterizadas por una hipofuncionalidad del SCE y, en general, de producir notables mejoras en el tratamiento de todos aquellos desórdenes donde los cannabinoides han demostrado ser altamente eficaces. Este abordaje permitiría evitar, además, los efectos indeseables asociados a una estimulación directa de los receptores CB₁, ya que el aumento en la concentración de los endocannabinoides se produciría sólo de forma local en aquellas zonas donde el ligando es fisiológicamente biosintetizado (Piomelli *y cols.*, 2000).

Así, inhibidores de los procesos de inactivación de los endocannabinoides podrían representar una interesante y novedosa estrategia para el tratamiento de diversas alteraciones tales como la nocicepción, siendo aplicable tanto al dolor inflamatorio como al neuropático, y también del shock hipotensivo, debido a sus acciones en el sistema cardiovascular (Giuffrida *y cols.*, 2001).

Respecto al sistema de recaptación, se ha descrito como inhibidores del ANT son capaces de aliviar la sintomatología asociada a una disfunción en el sistema dopaminérgico, en estrecha relación con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Beltramo *y cols.*, 2000b), así como de inducir notables mejoras en enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple (Baker *y cols.*, 2001) o el corea de Huntington (Lastres-Becker *y cols.*, 2002).

Por su parte, la FAAH puede constituir una prometedora diana terapéutica para el tratamiento del dolor y de ciertas enfermedades neuropsiquiátricas (Cravatt *y cols.*, 2001) mientras que su adecuado funcionamiento parece implicado en la correcta implantación y desarrollo embrionarios en las primeras etapas del embarazo (Maccarrone *y cols.*, 2000b; Maccarrone *y cols.*, 2002). El importante papel que la FAAH desempeña y que se deduce de todos estos datos está siendo confirmado en la actualidad con la reciente obtención de ratones que carecen de la enzima (ratones *knockout* o FAAH^{-/-}). Los resultados obtenidos con estos ratones indican que la FAAH juega un papel clave en la regulación de los procesos mediados por anandamida siendo la responsable del mantenimiento de un tono cannabinoide endógeno, el cual está implicado en la percepción del dolor (Cravatt *y cols.*, 2001).

5.6. Perspectivas futuras

El conocimiento sobre el SCE ha experimentado un espectacular crecimiento a lo largo de la última década favorecido por el esfuerzo multidisciplinar de químicos, bioquímicos y farmacólogos. Sin embargo quedan aún importantes cuestiones pendientes de clarificar. En concreto, dentro del sistema de inactivación de los endocannabinoides, algunos de los puntos más importantes son la caracterización molecular del transportador de endocannabinoides y el desarrollo de nuevos inhibidores del transportador y de la FAAH que, exhibiendo iguales o incluso mayores potencias inhibitorias, mejoren aún más los perfiles farmacológicos de los compuestos ya existentes, optimizando características tales como su solubilidad en agua o su biodisponibilidad.

Por último, una mayor profundización en el papel que el sistema de terminación (ANT y FAAH) juega dentro de los mecanismos de regulación del funcionamiento del SCE así como su influencia tanto en estados fisiológicos como patológicos son aún necesarios. Sólo esto permitirá establecer sin lugar a ninguna duda el potencial real del transportador y de la hidrolasa como dianas terapéuticas de interés que podrían abrir nuevos horizontes para el tratamiento de graves patologías para las cuales no existe aún una terapia médica adecuada.

Bibliografía

- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T y Di Marzo V (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* **15**:300-302.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A y Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* **277**:1094-1097.
- Beltramo M y Piomelli D (2000a) Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport.* **11**:1231-1235.
- Beltramo M, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Calignano A, Gorriti MA, Grammatikopoulos G, Sadile AG, Giuffrida A y Piomelli D (2000b) Reversal of dopamine D₂ receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J. Neurosci.* **20**:3401-3407.
- Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L y Di Marzo V (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **272**:3315-3323.
- Bisogno T, Maccarrone M, De Petrocellis L, Jarrhian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C y Di Marzo V (2001) The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur. J. Biochem.* **268**:1982-1989.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA y Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* **384**:83-87.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR y Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:9371-9376.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG y Di Marzo V (2000) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett.* **483**:52-56.
- Deutsch DG y Chin S (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* **46**:791-796.
- Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G y Moore LC (1997) Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* **100**:1538-1546.
- Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM, Kunz JS, Puffenbarger RA, Hillard CJ y Abumrad N (2001) The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **276**:6967-6973.

- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J-C y Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. **372**:686-691.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA y Kunos G (1999) Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur. J. Biochem*. **264**:258-267.
- Frazer A y Hensler JG (1999) Serotonin. En *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D., eds., Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, pgs. 273-275.
- Giang DK y Cravatt BF (1997) Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**:2238-2242.
- Giuffrida A, Beltramo M y Piomelli D (2001) Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **298**:7-14.
- Goparaju SK, Kurahashi Y, Suzuki H, Ueda N y Yamamoto S (1999) Anandamide amidohydrolase of porcine brain: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1441**:77-84.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A y Campbell WB (1997) Accumulation of *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem*. **69**:631-638.
- Hillard CJ y Jarrahan A (2000) The movement of *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem. Phys. Lipids*. **108**:123-134.
- Jacobsson SOP y Fowler CJ (2001) Characterization of palmitoylethanolamide transport in mouse neuro-2a neuroblastoma and rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells: comparison with anandamide. *Br. J. Pharmacol*. **132**:1743-1754.
- Jarrahan A, Manna S, Edgemond WS, Campbell WB y Hillard CJ (2000) Structure-activity relationships among *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J. Neurochem*. **74**:2597-2606.
- Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW y Schuster VL (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science*. **268**:866-869.
- Khanolkar AD y Makriyannis A (1999) Structure-activity relationships of anandamide, an endogenous cannabinoid ligand. *Life Sci*. **65**:607-616.
- Kuhar MJ, Couceyro PR y Lambert PD (1999) Catecholamines. En *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds., Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, pgs. 249-251.
- Lastres-Becker I, Hansen HH, Berrendero F, de Miguel R, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (2002) Alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse*. **44**:23-35.
- López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Lastres-Becker I, González S, Fernández-Ruiz J y Ramos JA (2001a) Derivados de ácido araquidónico con afinidad por el transportador de anandamida. PCT ES01/00305, WO 02/12167 A1.
- López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Lastres-Becker I, González S, Fernández-Ruiz J y Ramos JA (2001b) Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors. *J. Med. Chem*. **44**:4505-4508.
- López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Fernández-Ruiz J y Ramos JA (2002) Endocannabinoid transporter inhibitors. *Curr. Med. Chem.-Central Nervous System Agents* (en prensa).

- Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegenthart JFG y Finazzi-Agrò A (1998) Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J. Biol. Chem.* **273**:32332-32339.
- Maccarrone M, Bari M, Menichelli A, Del Principe D y Agrò AF (1999) Anandamide activates human platelets through a pathway independent of the arachidonate cascade. *FEBS Lett.* **447**:277-282.
- Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V y Finazzi-Agrò A (2000a) Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **275**:13484-13492.
- Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G y Finazzi-Agrò A (2000b) Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur. J. Biochem.* **267**:2991-2997.
- Maccarrone M, Bisogno T, Valensise H, Lazzarin N, Fezza F, Manna C, Di Marzo V y Finazzi-Agrò A (2002) Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Mol. Hum. Reprod.* **8**:188-195.
- Muthian S, Nithipatikom K, Campbell WB y Hillard CJ (2000) Synthesis and characterization of a fluorescent substrate for the *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) transmembrane carrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**:289-295.
- Patricelli MP y Cravatt BF (2000) Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family. *J. Biol. Chem.* **275**:19177-19184.
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* **9**:1553-1571.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A y Xie X-Q (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:5802-5807.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A y Rodríguez de Fonseca F (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**:218-224.
- Rakhshan F, Day TA, Blakely RD y Barker EL (2000) Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**:960-967.
- Reggio PH y Traore H (2000) Conformational requirements for endocannabinoid interaction with the cannabinoid receptors, the anandamide transporter and fatty acid amidohydrolase. *Chem. Phys. Lipids.* **108**:15-35.
- Schaffer JE y Lodish HF (1994) Expression, cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* **1994**:79, 427-436.
- Smart D y Jerman JC (2000) Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**:134.
- Taylor P y Brown JH (1999) Acetylcholine. En *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds., Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, pgs. 225-228.
- Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S y Deutsch DG (2000) The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem. Phys. Lipids.* **108**:107-121.
- Zygmunt PM, Chuang H-h, Movahed P, Julius D y Högestätt ED (2000) The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **396**:39-42.

Distribución del sistema endocannabinoide en el organismo

6

J. Romero

6.1. Introducción

El descubrimiento de un receptor para cannabinoides en el Sistema Nervioso Central (SNC), a finales de los años 80, supuso un punto de inflexión en el ámbito de investigación de la bioquímica y farmacología de estos compuestos químicos. Como se ha descrito en capítulos anteriores, sólo cuando se dispuso de ligandos químicos de mayor afinidad por este receptor cerebral que la que posee el principal cannabinoide natural presente en la planta *Cannabis sativa* (el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, ó THC), se consiguieron realizar con éxito ensayos de unión que permitieron hacer una primera aproximación a la localización de estos receptores en el SNC (Howlett *y cols.*, 1990).

Desde ese momento, nuestro conocimiento sobre el Sistema Cannabinoide Endógeno (SCE) ha crecido considerablemente. Así, sabemos de la existencia de, al menos, dos subtipos de receptores para cannabinoides en el organismo (denominados CB₁ y CB₂), varias moléculas endógenas que son consideradas los ligandos naturales para esos receptores (principalmente dos: la anandamida, ANA, y el 2-araquidonilglicerol, 2-AG), una proteína recaptadora específica para esos ligandos endógenos, así como el enzima responsable de su degradación (la amidohidrolasa de ácidos grasos, FAAH). De forma análoga a lo ocurrido con los receptores, sólo cuando se han podido aplicar técnicas analíticas de suficiente sensibilidad (por ejemplo, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas), se ha logrado hacer una cuantificación regional de los endocannabinoides conocidos hasta la fecha.

6.2. Receptores para cannabinoides

6.2.1. Receptores CB₁

Los receptores del tipo CB₁ se localizan casi exclusivamente en el SNC, aunque también se ha detectado su presencia en algunos tejidos periféricos, tales

como pulmón, células del endotelio vascular, células del músculo liso, células hematopoyéticas y testículo (para revisión, ver). Sin embargo, su abundancia y amplia distribución en el SNC, indica que son los mediadores de los efectos centrales de los cannabinoides.

Algunas publicaciones ya clásicas en el campo de investigación del SCE (Herkenham *y cols.*, 1990, 1991a y b ; Mailleux y Vandehaeghen, 1992; Tsou *y cols.*, 1998a) han desvelado que la mayor abundancia de los receptores CB₁ en el SNC se da en áreas relacionadas con el control de la actividad motora, tales como la corteza, ganglios basales y cerebelo:

- Corteza motora: los CB₁ se encuentran en las neuronas que producen el neurotransmisor glutamato y que proyectan desde la corteza hacia el estriado (en primates y humanos, el “estriado” se considera más correctamente como formado por 2 regiones, el “caudado” y el “putamen”). Estas neuronas constituyen la principal vía de entrada de señales de tipo excitatorio en el estriado, el cual es considerado como un auténtico “centro integrador” de señales nerviosas relacionadas con el movimiento.
- Ganglios basales: son un conjunto de núcleos que, desde el punto de vista anatómico y funcional, se encuentran estrechamente interrelacionados. Estos núcleos son: el estriado, el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia negra. En estos núcleos existen abundantes neuronas que sintetizan el neurotransmisor inhibitorio ácido γ -amino-butírico (GABA) y en las que se ubican los receptores CB₁ (Herkenham *y cols.*, 1991b). La densidad de receptores CB₁ en el globo pálido y la sustancia negra es la mayor de entre todas las áreas cerebrales.
- Es importante destacar también la localización de los receptores CB₁ en las neuronas glutamatérgicas que, partiendo del núcleo subtalámico, alcanzan la sustancia negra. Su importancia radica en, por un lado, el estado activo que estas neuronas presentan en condiciones basales y, por otro lado, en el papel crucial que parece jugar el núcleo subtalámico en la enfermedad de Parkinson.
- Cerebelo: los receptores CB₁ se encuentran en neuronas de tipo GABAérgico, fundamentalmente en la capa molecular de la corteza cerebelosa. También en esta zona la presencia de los receptores CB₁ es muy elevada (equiparable a la del globo pálido y sustancia negra).

Se sabe, además, que la localización de los receptores CB₁ en estas estructuras es preferentemente presináptica, lo cual coincide en buena medida con el efecto inhibitorio que los cannabinoides ejercen sobre la liberación de varios neurotransmisores (Pertwee, 1997). Dicha localización se ha podido conocer gracias a los trabajos realizados en los años 90 en los que se lesionaban vías neuronales específicas con agentes tóxicos (Herkenham *y cols.*, 1991 b), así como determinando la presencia del ARNm que codifica para los receptores CB₁, mediante la técnica de hibridación *in situ* (Mailleux y Vandehaeghen, 1992). De esta manera pudo deducirse que la síntesis de las proteínas receptoras CB₁ tiene lugar en el cuerpo celular de las neuronas que forman esos circuitos de comunicación (y que se ubican en la corteza, el estriado y la capa granular del cerebelo) y son posteriormente transportadas a sus destinos definitivos (estriado, globo pálido y sustancia negra y capa molecular del cerebelo, respectivamente).

Este conocimiento de la distribución de los receptores CB₁ nos permite actualmente destacar el posible interés terapéutico que puede suponer la modulación de la actividad de estos receptores, ya que muchas de las estructuras mencionadas, en las que se da una masiva presencia de los mismos, están involucradas en diversas patologías de gran impacto clínico (en concreto, la enfermedad de Parkinson). La enfermedad de Huntington, aunque de menor impacto en la población general, representa también un posible campo de investigación para la posible utilización terapéutica de agentes moduladores de la actividad de los receptores CB₁. Además de en estas regiones, los receptores CB₁ son también abundantes en áreas importantes para la memoria y el aprendizaje (como el hipocampo) y para la regulación neuroendocrina (como son diversos núcleos hipotalámicos).

6.2.2. Receptores CB₂

En términos generales y, a diferencia de los CB₁, los receptores CB₂ están ausentes del SNC. Su expresión está limitada a células del sistema inmune: macrófagos, células B y “natural killer” (NK), monocitos, neutrófilos y células T. En algunas de estas poblaciones celulares, los niveles de expresión de los receptores CB₂ es equiparable, desde el punto de vista cuantitativo, a los de los receptores CB₁ en el SNC (Galiege y cols., 1995).

Todos los tipos celulares mencionados intervienen en los procesos inflamatorios, por lo que se considera que los receptores CB₂ pueden desempeñar importantes funciones en esos fenómenos. Su presencia en esas células podría explicar buena parte de los efectos moduladores que ejercen los cannabinoides naturales y sintéticos sobre la respuesta inmune (Kaminski, 1998).

6.3. Ligandos endógenos (“endocannabinoides”)

La naturaleza lipofílica de los ligandos endógenos de los receptores para cannabinoides ha tenido como consecuencia el que su aislamiento y cuantificación haya sido especialmente compleja. De hecho, se han empleado diversas técnicas analíticas para lograrlo (principalmente cromatografía de gases-espectrometría de masas y cromatografía líquida-espectrometría de masas), con resultados dispares. Así, los datos publicados hasta el momento varían entre un rango llamativamente amplio de concentraciones de endocannabinoides, que van desde varios centenares de picomoles (10^{-12} moles) por gramo de tejido hasta apenas unas decenas de femtomoles (10^{-15} moles) por gramo de tejido (Porter y Felder, 2001).

Especialmente significativa es la presencia de ANA y 2-AG en estructuras pertenecientes a los ganglios basales del cerebro de la rata en cantidades superiores a las medidas en otras áreas del cerebro. En concreto, dos regiones críticas en el control del movimiento y que contienen la mayor densidad de receptores CB₁, como son el globo pálido y la sustancia negra, poseen los mayores niveles de endocannabinoides en el cerebro de rata (Dí Marzo, 2000). Este dato refuerza el especial papel que el SCE parece desempeñar en el control de las actividades motoras.

Respecto a los niveles de endocannabinoides en el cerebro humano, se han encontrado niveles detectables de ANA en hipocampo y corteza asociada, estriado y cerebelo, esto es, regiones ricas en receptor CB₁, así como en tálamo y en algunos tejidos periféricos (bazo, corazón, etc). Sin embargo, sólo se han encontrado trazas de ANA en suero, plasma y líquido cefalorraquídeo, lo que coincidiría con el papel neuromodulador y no de naturaleza hormonal que se atribuye a los endocannabinoides (Felder *y cols.*, 1996).

6.4. Recaptador de endocannabinoides

La finalización de la señal transmisora de los endocannabinoides requiere de la participación de una proteína recaptadora, específica para estas moléculas, tal y como ocurre para muchos de los neurotransmisores “clásicos”. Aunque dicha molécula todavía no ha podido ser aislada y caracterizada por completo, sí existen algunos datos acerca de su posible distribución en el organismo. Giuffrida *y cols.*, 2001, han llevado a cabo experimentos de marcaje radiactivo sobre secciones de tejido de rata, observando que dicha recaptación parece ser intensa en áreas de la corteza somatosensorial, motora y límbica, así como en estriado, hipocampo, tálamo, septo, sustancia negra, amígdala e hipotálamo, esto es, en áreas prácticamente coincidentes con las de mayor abundancia de los receptores CB₁. Mediante experimentos *in vitro*, sabemos también que este mecanismo de recaptación es activo tanto en neuronas como en células gliales (Di Marzo *y cols.*, 1994).

También en tejidos periféricos parece existir este mecanismo de recaptación específico para los endocannabinoides, por ejemplo en macrófagos, células endoteliales y algunas líneas celulares experimentales. Aunque las características cinéticas y farmacológicas de este mecanismo de captación en tejidos periféricos son muy similares al del SNC, hay datos que apuntan a la existencia de importantes diferencias en los mecanismos de captación de endocannabinoides a nivel central y periférico (Giuffrida *y cols.*, 2001).

6.5. Amidohidrolasa de ácidos grasos

Aunque su existencia y actividad enzimática fueron descubiertas años antes del aislamiento del primer endocanabinoide, la FAAH es considerada hoy en día como la principal enzima degradativa en el catabolismo de estos ligandos endógenos (Ueda *y cols.*, 2000). En el cerebro de la rata, esta proteína integral de membrana se encuentra en neuronas de gran tamaño (piramidales de la corteza, piramidales del hipocampo, células de Purkinje en el cerebelo, etc), mostrando una distribución prácticamente coincidente con la de los receptores CB₁ (Tsou *y cols.*, 1998b).

En el cerebro humano, la FAAH muestra también un patrón de distribución muy amplio, tanto en elementos neuronales como gliales. Así, las neuronas piramidales de la corteza motora, piramidales del hipocampo, células de Purkinje en el cerebelo, células espinosas de tamaño medio en el estriado y células de la sustancia

negra en el mesencéfalo presentan altos niveles del enzima. Curiosamente, en el cerebro humano también se ha observado la presencia de la FAAH en astrocitos, particularmente en aquéllos que acompañan a las paredes de los vasos sanguíneos. Por ello, se considera que la FAAH y, por consiguiente, el SCE, pueden desempeñar un importante papel en la regulación del tono de los vasos sanguíneos en el cerebro.

Especialmente significativa es la localización pre- y postsináptica del enzima en las neuronas pertenecientes al circuito de los ganglios basales; en concreto, tanto en las neuronas glutamatérgicas que, partiendo de la corteza alcanzan el estriado, como en el bucle formado por las proyecciones estriato-nigrales y nigro-estriatales, la presencia de la FAAH es muy abundante. De estos datos se deduce que la FAAH puede colaborar de forma determinante en el papel que el SCE parece jugar en el control motor.

6.6. Conclusiones

Los distintos elementos que componen el SCE son muy abundantes en el organismo, especialmente en el SNC. En general, la localización de estos constituyentes se corresponde bien con los efectos que provoca la administración exógena de cannabinoides naturales y sintéticos, tanto en humanos como en animales de experimentación. En particular, los efectos sobre la coordinación motora, la memoria y ciertos parámetros hormonales tienen su correlación en cuanto a la distribución de receptores, ligandos y mecanismos de finalización de la transmisión nerviosa.

Bibliografía

- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC y Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. **372**:686-691.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR y Brotchie JM (2000) Enhanced levels of endocannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J*. **14**:1432-1438.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppe GA, Paul SM y Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*. **393**:231-235.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D y Carayon P (1995) Expression of central and cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. **232**:54-61.
- Giuffrida A, Beltramo M y Piomelli D (2001) Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. **298**:7-14.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa DR y Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**:1932-1936.

- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Melvin LS, Johnson MR, de Costa DR y Rice KC (1991a) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* **11**:563-583.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR y Richfield EK (1991b) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res.* **547**:267-264.
- Howlett AC, Bidaut-Rusell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR y Herkenham M (1990) The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci.* **13**:420-423.
- Kaminski NE (1998) Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol.* **83**:124-132.
- Mailleux P y Vanderhaeghen JJ (1992a) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience.* **48**:655-668.
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther.* **74**:129-180.
- Porter AC y Felder CC (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* **90**:45-60.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K y Walker JM (1998a) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* **83**:393-411.
- Tsou K, Nogueron MI, Muthian S, Sañudo-Peña M, Hillard CJ, Deutsch DG y Walker JM (1998b) Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett.* **254**:137-140.
- Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S y Deutsch DG (2000) The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem. Phys. Lipids.* **108**:107-121.

**Fisiología,
farmacología y terapéutica
de los cannabinoides**



Cannabinoides y control nociceptivo

A.J. Carrascosa y J. Manzanares

7.1. Introducción

La búsqueda de fármacos analgésicos que presenten ventajas frente a los ya existentes (fundamentalmente opiáceos) representa un objetivo fundamental de la investigación farmacológica. Por ello, resulta de sumo interés abordar el estudio de nuevas familias de analgésicos con mecanismo central, potencia elevada y mínimos efectos indeseables. En los últimos años, los cannabinoides endógenos se han revelado como un nuevo sistema de neuromodulación central y periférico gracias a su acción sobre receptores CB1 y CB2. La síntesis de agonistas cannabinoides sintéticos con una acción analgésica comparable a la de los opiáceos ha renovado el interés en la búsqueda de aplicaciones de estos compuestos en el tratamiento del dolor (cáncer, migraña, artritis, dolor postoperatorio agudo, esclerosis múltiple).

7.2. Mecanismo de acción de la actividad antinociceptiva cannabinoide

Los receptores implicados en la actividad antinociceptiva de los cannabinoides pueden ser cannabinoides y no cannabinoides (vanilloides) (Pertwee, 2001). Básicamente, la antinocicepción se debe a la activación de los receptores cannabinoides, sobre todo CB1. De esta manera, se puede establecer una alta correlación entre la potencia antinociceptiva de una serie de agonistas cannabinoides, su capacidad para desplazar radioligandos del receptor CB1 y para inhibir la señal de traducción (los receptores CB1 se encuentran acoplados a proteínas G_i y su unión al receptor produce una inhibición de la adenilato ciclasa). Asimismo, la antinocicepción inducida por agonistas cannabinoides puede bloquearse o atenuarse con antagonistas selectivos de los receptores CB1 o mediante bloqueo con anticuerpos para el receptor CB1. De hecho, se ha constatado ausencia o disminución de respuesta antinociceptiva en animales desprovistos (“knock out”) del gen para el receptor

CB1 tras administración de agonistas cannabinoides (Ledent *y cols.*, 1999). La antinocicepción inducida por los cannabinoides puede atenuarse con la toxina pertussis y otras sustancias que actúen sobre la traducción de la señal de los receptores CB1 (Welch *y cols.*, 1995). Los receptores CB2, relacionados clásicamente con la modulación de la respuesta inmunológica, se encuentran también implicados en la antinocicepción modulando la liberación de factores pro e inflamatorios de células no neuronales localizadas en la proximidad de neuronas nociceptivas (los receptores CB1 se relacionan más con la modulación de transmisión del dolor a través del sistema nervioso central) (Malan *y cols.*, 2001). En el sistema nervioso central no se ha detectado expresión del gen del receptor CB2 en tejido neuronal de cerebro humano o de rata, sin embargo se ha puesto de manifiesto su presencia en la microglia de cerebro de rata y en tejido cerebral de ratón (Pertwee, 2001).

La anandamida y algunos cannabinoides eicosanoides pueden activar receptores vanilloides, no cannabinoides CB1 o CB2 (Zygmunt *y cols.*, 1999). Los receptores vanilloides pueden ser los responsables de las acciones antinociceptivas inducidas por la administración sistémica de anandamida que no son bloqueables por antagonistas del receptor CB1.

Existen sistemas de modulación nociceptiva regulados por la acción agonista-receptor cannabinoide. La relación más importante es la que implica al sistema opioide (Manzanares *y cols.*, 1999). De hecho, se han descrito importantes características comunes entre los 2 sistemas de neuromodulación cannabinoide y opioide. En primer lugar, un sistema de traducción de la señal análogo: la unión a receptores opiáceos o cannabinoides activa las proteínas $G\alpha_i/G\alpha_o$, inhibe la adenilatociclasa ($\Rightarrow \downarrow \text{AMPC}$), se produce la apertura de canales de K^+ ($\Rightarrow \uparrow K^+$) y el cierre de canales de Ca^{2+} a través de una proteína G sensible a la toxina pertussis ($\Rightarrow \downarrow Ca^{2+}$). En segundo lugar, ambos sistemas de neuromodulación poseen ligandos endógenos y un sistema descendente analgésico. En tercer lugar, la activación de ambos sistemas produce efectos clínicos similares: analgesia, desarrollo de tolerancia y dependencia, hipotermia, sedación, hipotensión. En cuarto lugar, la naloxona bloquea la antinocicepción inducida por opiáceos y cannabinoides. No obstante, los resultados obtenidos en referencia a los efectos cannabinoides parecen depender del modelo seleccionado para medir la actividad antinociceptiva (p. ej., el modelo de la placa caliente -valora la respuesta supraespinal; el modelo de la retirada de la cola- es más espinal), de la diferente presencia de los receptores en el lugar de aplicación, y de las dosis empleadas (altas dosis de naloxona actúan sobre todo tipo de receptores opiáceos). Así, hay estudios que afirman no haber sido capaces de bloquear los efectos antinociceptivos inducidos por cannabinoides (Welch, 1993). En cambio, otros han concluido que bajas dosis (1-5 mg/kg) de naloxona antagonizan parcialmente y altas dosis (10 mg/kg) bloquean totalmente la antinocicepción del THC (actuarían sobre todo tipo de receptores) (Fuentes *y cols.*, 1999). Más específicamente, la acción antinociceptiva de los cannabinoides se puede antagonizar con antagonistas de receptores opiáceos κ (nor-binaltorfimina) o anticuerpos para la dinorfina (ligando endógeno de receptores κ) tras administración intradural y/o periférica (Fuentes *y cols.*, 1999).

Los mecanismos bioquímicos que explican la interacción sinérgica entre el sistema cannabinoide y opioide pueden relacionarse con la interacción a nivel de la traducción de las señales causadas por el agonista opioide y cannabinoide y la

liberación o no de diversos mediadores relacionados con la modulación de la nocicepción e inflamación. Es interesante mencionar que los cannabinoides y opioides inducen una inhibición gabérgica de las neuronas que se proyectan desde la sustancia gris periacueductal y bulbo ventromedial rostral al no permitir su liberación (Vaughan *y cols.*, 1999), y facilitan la liberación de noradrenalina (NA) en neuronas descendentes (Lichtman y Martin, 1991; Pertwee, 2001). Por otro lado, la administración de cannabinoides aumenta la liberación y síntesis de péptidos opioides endógenos (Manzanares *y cols.*, 1999). De esta manera, la administración de agonistas del receptor cannabinoide CB1 estimula la transmisión opioidérgica (fundamentalmente encefalinas, dinorfinas y β -endorfina). Este mecanismo implica la potenciación de la antinocicepción mediante la acción sinérgica de opiáceos y cannabinoides y/o mediante la asociación de agentes cannabinoides con inhibidores selectivos de la degradación de opioides (Fuentes *y cols.*, 1999).

Otras relaciones entre el cannabis y las sustancias moduladoras de la nocicepción implican al neuropéptido CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina "calcitonin gene-related peptide"), un neuropéptido con función algica (Richardson *y cols.*, 1998). Los cannabinoides modulan la inflamación neurogénica al inhibir la neurosecreción del CGRP en las terminaciones centrales y periféricas de fibras aferentes primarias. Los cannabinoides inhiben la producción de eicosanoides por lo que facilitan la antinocicepción al actuar sobre mediadores de la inflamación (Martin, 1986).

7.3. Lugar de acción de la analgesia cannabinoide: acción antinociceptiva central y periférica

La actividad antinociceptiva cannabinérgica central se debe a la presencia de receptores a nivel supraespinal y espinal. La administración de agonistas cannabinoides permite la disminución de la intensidad de entrada del impulso nociceptivo en el cerebro al alterar el sistema de control ascendente y descendente. Por lo tanto, se reduce la percepción central del dolor y el descenso de la actividad espontánea y evocada de los centros supraespinales por la actuación de un sistema descendente. El control de la respuesta antinociceptiva depende de la vía de administración de los agonistas del receptor cannabinoide: 1) los antagonistas κ opiáceos son eficaces cuando se administran intradural pero no intracerebroventricularmente (Fuentes *y cols.*, 1999); 2) los antagonistas CB1 son más eficaces a nivel supraespinal que espinal (Welch, *y cols.*, 1998). Estos resultados sugieren una interacción diferente de los agonistas cannabinoides con el receptor CB1 o la existencia de subtipos de receptor CB1.

La acción antinociceptiva a nivel supraespinal se confirma mediante administración de agonistas cannabinoides intracerebroventricularmente o en estructuras cerebrales a dosis que resultan inactivas en administración intravenosas (Pertwee, 2001). El mecanismo puede ser aferente o eferente. A nivel aferente, se activan los receptores supraespinales en el núcleo posterolateralventral del tálamo (área que contiene numerosas neuronas nociceptivas que llegan a través del tracto espinotalámico) y se inhibe la actividad aferente transmitida por las vías espinotalámicas. A nivel eferente, la activación de los receptores centrales deprime la actividad

espontánea y evocada de estos centros mediante la actuación de un sistema descendente hacia la médula espinal que actuaría en las terminales presinápticas de la médula espinal. Es significativo que la analgesia cannabinoide se produce tras microinyecciones en la sustancia gris periacueductal, la amígdala y el bulbo ventromedial rostral, estructuras interconectadas bien conocidas como áreas del sistema opioide descendente. En este sentido, se ha demostrado que los cannabinoides administrados en esta zona inducen una acción analgésica en ratas, efecto que se bloquea con la administración simultánea de toxina pertussis.

La acción antinociceptiva espinal se confirma comprobando la eficacia cannabinoide mediante administración intradural (Pertwee, 2001). Los receptores cannabinoides a este nivel se encuentran en menor cantidad que en áreas cerebrales. Se localizan en las terminaciones de neuronas que proyectan del cerebro y en las interneuronas de la zona espinal (especialmente en capas I, III y X de la médula espinal). Actúan fundamentalmente a nivel aferente: la activación de los receptores espinales (localizados presinápticamente en neuronas aferentes primarias) inhibe la entrada de impulsos procedentes de las fibras aferentes somatosensoriales (fibras C) sin modificar la sensibilidad propioceptiva (Drew *y cols.*, 2000).

La actividad cannabínérgica periférica se confirma comprobando la antinocicepción tras administración intradérmica de agonistas CB1 y CB2 (Richardson *y cols.*, 1998; Malan *y cols.*, 2001). Los receptores cannabinoides responsables, en cantidad considerablemente más pequeña que en el sistema nervioso central, están más relacionados con la modulación de la liberación de factores pro- e inflamatorios de las células no neuronales localizadas en la proximidad de neuronas nociceptivas que con la transmisión del dolor a través del sistema nervioso central (hecho que se debe a la presencia de receptores CB1). Es interesante destacar la presencia de receptores cannabinoides (tanto CB1 y CB2) en los ganglios de las raíces dorsales (GRD). Considerando que los GRD constituyen la puerta de entrada del estímulo nociceptivo a la médula espinal, la presencia de receptores cannabinoides permite modular la antinocicepción a este nivel. Actualmente se considera que en los GRD se sintetizan los receptores que se transportan a través de los axones a la periferia (Hohman y Herkenham, 1999).

7.4. Características de la analgesia cannabinoide

Desde el punto de vista experimental, la actividad analgésica de los agonistas del receptor cannabinoide es similar a la de los opiáceos, tanto en modelos de dolor por exceso de nocicepción como en modelos de dolor visceral y neuropático (Pertwee, 2001). Así, agonistas cannabinoides como el Δ^9 -THC administrados por vía no perimedular (iv,sc,im,po) presentan una potencia similar a la morfina habiendo incluso cannabinoides con una actividad antinociceptiva más potente que el Δ^9 -THC. No obstante, hay estudios que han llegado a la conclusión que la potencia antinociceptiva de los cannabinoides resulta menor que la de la morfina. Tras administración perimedular (intradural, intraventricular) la antinocicepción es similar a dosis mucho menores y con una duración mayor en comparación a las no perimedulares (Pertwee, 2001).

La potencia dependerá de su estructura, la dosis (a más dosis, mayor efecto) y la liposolubilidad (la potencia antinociceptiva del cannabinoide administrado espinalmente se correlaciona negativamente con la liposolubilidad).

El alivio del dolor es más pronunciado en dolor tónico y alodinia que en dolor agudo inducido en tejido sano (Pertwee, 2001). Existen distintas hipótesis para explicar este hecho. Por un lado, los cannabinoides actúan sobre todo inhibiendo o liberando una serie de moduladores desde las neuronas y/o tejidos no neuronales, por lo que la antinocicepción será más rápida e intensa si los tejidos están lesionados o inflamados (los mediadores se encuentran en cantidades relativamente altas). Por otro lado, la mayor eficacia de los cannabinoides en comparación a los opioides en el manejo del dolor neuropático se justifica por la presencia de receptores cannabinoides en las fibras aferentes primarias de diámetro grande ($A\beta$ y $A\delta$), ya que este dolor es en parte debido a descargas espontáneas de las fibras mielínicas $A\beta$ y $A\delta$. Estas fibras contienen pocos receptores μ en comparación con los cannabinoides (en las fibras de pequeño diámetro hay más receptores μ que cannabinoides) (Fox *y cols.*, 2001).

Los estudios clínicos realizados en humanos, realizados por vías no perimedulares, muestran que los cannabinoides son sustancias analgésicas *per se* con una potencia similar a opiáceos como la codeína (Campbell *y cols.*, 2001). No existe bibliografía sobre la analgesia tras administración de agonistas cannabinoides perimedularmente.

7.5. Sinergismo de la acción antinociceptiva cannabinoide con otras moléculas

La interacción sinérgica entre el sistema cannabinoide y opioide se ha demostrado experimentalmente. Existe abundante información de esta acción farmacológica sinérgica cuando se administran cannabinoides y opiáceos conjuntamente por vías no perimedulares (Pertwee, 2001). También se ha confirmado cuando la administración de un compuesto se realiza por vía no perimedular o perimedular (Reche *y cols.*, 1998). La potenciación entre un opiáceo y un cannabinoide también está descrita cuando se realiza por vía intradural y/o intracerebroventricular (Pertwee, 2001).

La potenciación con antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) se basa en la estructura común entre los ligandos endógenos de receptores cannabinoides y los eicosanoides, ya que ambos tipos de moléculas son derivados del ácido araquidónico. En este sentido, cabe resaltar el hecho de que los cannabinoides interactúan con el metabolismo de eicosanoides y que, por otra parte, se ha demostrado una acumulación de ácido araquidónico como respuesta a la adición de derivados del cannabis a preparaciones de cortes de cerebro. En la práctica, tan sólo el ibuprofeno se ha mostrado como inhibidor del metabolismo de la anandamida (Fowler *y cols.*, 1997).

7.6. Inconvenientes de los cannabinoides en el tratamiento del dolor

A corto plazo, los efectos secundarios de los cannabinoides en el hombre se relacionan fundamentalmente con depresión del sistema nervioso central. Así, pueden producir obnubilación, desorientación, ataxia, vértigos, desconexión, sequedad de boca, visión borrosa y alteraciones de la memoria (Campbell, 2001; Ashton,

1999). En general, con dosis de 20 mg po de THC los pacientes muestran sedación profunda. Es interesante destacar que la dosis de 5 mg de THC se tolera bien en dolor neuropático sin causar alteraciones de la conciencia. Los efectos cardiovasculares son generalmente moderados y bien tolerados. Puede aparecer hipotensión en comparación con placebo, pero no mayor que con codeína. Los cambios en la función cardiaca no son significativos. Se han empleado otros agonistas cannabinoides diferentes al THC con resultados diversos. El levonantradol presenta una incidencia mayor de efectos secundarios que el THC en muchos pacientes pero ninguno considerado grave. El análogo nitrogenado del THC no afecta la función cardiaca pero produce somnolencia en un 40% de los pacientes. La benzopiranoperidina induce un grado de sedación similar a la codeína pero no es efectiva como analgésico.

A largo plazo, los principales efectos secundarios son el desarrollo de tolerancia y dependencia. El uso crónico de cannabis no produce graves alteraciones cognitivas tal y como ocurre con otras sustancias como el alcohol, aunque sí puede agravar enfermedades mentales preexistentes habiéndose constatado un aumento de hasta 6 veces de la incidencia de esquizofrenia y otras psicosis. Por otra parte, se ha constatado la aparición de un síndrome de abstinencia asociado al consumo de cannabinoides, que resulta ser de sintomatología y características similares al provocado por los opioides, si bien de menor intensidad. A nivel del aparato respiratorio, dosis altas de cannabis fumadas se asocian a un incremento de bronquitis crónica y deterioro de la función pulmonar. En cuanto al aparato reproductor los datos clínicos son escasos. En obstetricia, fumar cannabis puede predisponer a la prematuridad, aunque no se han evidenciado incrementos de defectos fetales. Por último, no hay evidencia en humanos del deterioro del sistema inmunológico (tanto a nivel humoral como celular).

Los cannabinoides presentan una toxicidad muy baja. No se han publicado muertes humanas asociada al consumo de cannabis. La dosis letal 50 (DL₅₀) de THC en roedores (dosis necesaria para producir la mortalidad del 50 % de roedores) es altísima comparada con la de otras sustancias.

7.7. Aplicaciones clínicas de la analgesia cannabinoide

En dolor agudo (ej., postoperatorio) hay bibliografía en relación a las vías parenterales (sc,im,iv) ya que la vía oral no es recomendable (íleo paralítico, efecto primer paso, etc.) y las vías perimedulares no se pueden emplear por falta de estudios experimentales. La conclusión es que el levonantradol 1,5-3 mg im es más efectivo que el placebo para el control del dolor. Los efectos adversos se consideran leves.

En dolor crónico la vía oral ha sido la más utilizada. Para dolores neoplásicos, la benzopiranoperidina (análogo del THC) a dosis de 2-4 mg no ha sido tan efectiva como el sulfato de codeína a dosis de 60-120 mg y no más efectiva que el placebo. El THC a dosis de 10 mg po presenta una potencia similar a 60 mg de codeína. En efecto, 20 mg de THC po son equipotentes con 120 mg de codeína. Dosis mayores de THC se asocian a efectos indeseables no tolerables. Se ha empleado un análogo sintético nitrogenado del THC a dosis de 1 mg po con un efecto superior al placebo y equivalente a 50 mg de fosfato de codeína. En dicho estudio se comprobó que la analgesia producida es mayor que con 50 mg de secobarbital.

Para dolor crónico no neoplásico, el THC no ha sido mejor que el placebo en el alivio del dolor de 2 casos de fiebre familiar mediterránea. Aunque la cantidad de morfina usada para paliar el dolor fue más baja, la sustancia que se asociaba al opiáceo fue mayor con placebo que con THC (410 mg en comparación con 170 mg a lo largo de 3 semanas). En el tratamiento de 1 paciente con dolor neuropático y espasticidad secundaria a un ependimoma en médula espinal, la administración de 5 mg de THC fueron equivalentes a 50 mg de codeína. Estas 2 sustancias son superiores al placebo. La ventaja adicional del uso del THC fue el efecto beneficioso sobre la espasticidad.

Las vías parenterales (iv, im, sc) también se han empleado en dolor crónico. Existe bibliografía en dolor por miembro fantasma, dolor asociado a esclerosis múltiple y lesión de médula espinal. También se ha utilizado en el tratamiento de las migrañas.

7.8. Conclusión

En los últimos 10 años se ha descrito un sistema de neuromodulación cannabinoide, se han sintetizado agonistas de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 y preparado formas farmacéuticas para su utilización terapéutica. Los datos recogidos en numerosas publicaciones científicas demuestran la actividad antinociceptiva de los agonistas cannabinoides y por lo tanto sugieren su utilización en el tratamiento del dolor. Aunque todavía es necesario realizar muchos ensayos clínicos para demostrar en qué patologías y en qué condiciones la utilización de agentes cannabinoides puede resultar más beneficiosa que los fármacos que actualmente se encuentran disponibles en el arsenal terapéutico para el tratamiento del dolor (fundamentalmente opiáceos y antiinflamatorios), los ensayos realizados hasta el momento sugieren la posibilidad de conseguir efectos sinérgicos asociando estos compuestos a dosis menores de opiáceos. Las estrategias farmacológicas para potenciar las acciones antinociceptivas de los cannabinoides manteniendo limitados la aparición de efectos indeseables comprenden la posibilidad de combinar la administración de preparados farmacéuticos de agonistas cannabinoides con opiáceos y/o con inhibidores de la degradación de péptidos opioides, o bien combinar los agentes cannabinoides u opiáceos con inhibidores de la recaptación de anandamida, potenciando de esta manera los efectos analgésicos y minimizando la aparición de efectos secundarios.

Bibliografía

- Ashton CH (1999) Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *Br J Anaesth.* **83**:637-649.
- Campbell FA, Tramer MR, Carroll D, Reynolds DJM, Moore RA y McQuay HJ (2001) Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ.* **323**:13-16.
- Drew LJ, Harris J, Millns PJ, Kendall DA y Chapman V (2000) Activation of spinal cannabinoid 1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases (35S)GTP. $\text{GT}\gamma\text{S}$ binding in the dorsal horn of the spinal cord of non-inflamed and inflamed rats. *Eur. J. Neurosci.* **12**:2079-2086.

- Fowler CJ, Stenstrom A y Tiger G (1997) Ibuprofen inhibits the metabolism of the endogenous cannabimimetic agent anandamide. *Pharmacol. Toxicol.* **80**:103-107.
- Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L y James I (2001) The role of central and peripheral cannabinoid 1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain.* **92**:91-100.
- Fuentes JA, Ruiz-Gayo M, Manzanares J, Vela G, Reche I y Corchero J (1999) Cannabinoids as potential news analgesics. *Life Sci.* **65**:675-685.
- Hohmann AG y Herkenham M (1999) Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience.* **92**:1171-1175.
- Iversen L y Chapman V (2002) Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**:50-55.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W y Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science.* **283**:401-404.
- Lichtman AH y Martin BR (1991) Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal $\alpha 2$ -noradrenergic mechanism. *Brain Res.* **559**:309-314.
- Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F y Makriyannis A (2001) CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain.* **93**:239-245.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA y Fuentes JA (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *TiPS.* **20**:287-294.
- Pertwee RG (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol.* **63**:569-611.
- Martin BR (1986) Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol Rev.* **38**:45-75.
- Reche I, Ruiz-Gayo M y Fuentes, JA (1998) Inhibition of opioid-degrading enzymes potentiates D9 -tetrahydrocannabinol-induced antinociception in mice. *Neuropharmacol.* **37**:215-222.
- Richardson JD, Kilo S y Hargreaves KM (1998) Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB 1 receptors. *Pain.* **75**:111-119.
- Richardson JD, Aanonsen L y Hargreaves KM (1998) Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol.* **345**:145-153.
- Vaughan CW McGregor IS, Christie MJ (1999) Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **127**:935-940.
- Welch SP (1993) Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimine, but not N, N- diallyl-tyrosine-Aib-phenyl-alanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**:633-640.
- Welch SP, Thomas C y Patrick GS (1995) Modulation of cannabinoid induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**:310-321.
- Welch SP, Huffman JW y Lowe J (1998) Differential blockade of the antinociceptive effects of centrally administered cannabinoids by SR141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**:1301-1308.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørgard M, Di Marzo V, Julius D y Högestätt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* **400**:452-457.

Cannabinoides y actividad motora

I. Lastres-Becker, A. Cabranes, E. De Lago y J. Fernández-Ruiz

8.1. Introducción

Como se ha venido detallando a lo largo de diferentes capítulos de esta guía, en los últimos años, se ha producido una importante eclosión de los estudios sobre el sistema endocannabinoide que ha conducido, entre otros hechos, a un desarrollo significativo de la farmacología de este sistema en términos de cantidad (se han desarrollado nuevos compuestos sintéticos) y calidad (compuestos cada vez más selectivos), lo que ha representado el poder disponer de un amplio arsenal de moléculas para el tratamiento de determinadas patologías (Pertwee, 2000). Uno de los tipos de patologías que mayor interés suscita en relación a la posible utilidad de los cannabinoides, son las enfermedades motoras, ya que se ha demostrado que el sistema endocannabinoide participa en el control del movimiento, como lo hacen otros neurotransmisores más clásicos como la dopamina, el GABA o el glutamato (Consroe, 1998; Sañudo-Peña *y cols.*, 1999; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002). Dos de las enfermedades motoras de mayor incidencia, como son la enfermedad de Parkinson y el corea de Huntington, han centrado la mayor parte de los estudios acerca de una posible utilidad de los cannabinoides (Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002). Sin embargo, existen otras patologías neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple, que aunque no son enfermedades motoras en origen, presentan importantes alteraciones del movimiento, por lo que también se están estudiando en relación a un posible beneficio de los cannabinoides en el tratamiento de estos síntomas (Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002). En este capítulo, pretendemos abordar este aspecto de la funcionalidad del sistema endocannabinoide, el control del movimiento (cuyos sustratos neurobiológicos residen principalmente en los ganglios basales), yendo desde los conocimientos básicos que ahora disponemos acerca de cómo funciona este sistema en los ganglios basales, hasta los datos que ya se han obtenido sobre una posible utilidad de sustancias activas sobre el sistema endocannabinoide en diversas patologías motoras.

8.2. Función del sistema endocannabinoide en los ganglios basales

Numerosos estudios desarrollados principalmente en la última década permiten realizar la siguiente afirmación: “el sistema endocannabinoide actúa como modulador a nivel de los ganglios basales y participa, por tanto, en el control de la actividad motora”. Esta afirmación deriva de las siguientes observaciones:

- Los cannabinoides son capaces de producir importantes cambios en la actividad motora en humanos y animales de experimentación (Consroe, 1998; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002)
- Los cannabinoides alteran la funcionalidad de los tres neurotransmisores que tienen una participación más destacada a nivel de los ganglios basales, es decir, la dopamina, el GABA y el glutamato (Sañudo-Peña *y cols.*, 1999; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002)
- Los diferentes elementos que forman parte del sistema endocannabinoide, es decir tanto los ligandos endógenos como sus receptores, se encuentran presentes de forma abundante en los ganglios basales (Herkenham *y cols.*, 1991; Bisogno *y cols.*, 1999; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002)

8.2.1. Los cannabinoides afectan la actividad motora

En la Tabla 8.1, se recoge un resumen de los efectos motores producidos por la administración de diferentes tipos de cannabinoides en animales de experimentación. Estos datos, en su conjunto, apoyan la idea de que el sistema endocannabinoide desarrolla un importante papel a nivel de los ganglios basales, de forma que aquellas sustancias vegetales, sintéticas o endógenas que activan directa o indirectamente los receptores CB₁ producen efectos inhibitorios a nivel motor, que se manifiestan en roedores por descensos de la actividad espontánea (ambulación) y también de la frecuencia de aparición de actividades no-ambulatorias (estereotipias), y por un aumento de la inactividad llegando incluso a la catalepsia (Romero *y cols.*, 1995; González *y cols.*, 1999; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002). Los agonistas CB₁ también son capaces de potenciar el efecto de otras sustancias que también reducen el movimiento, como el muscimol o la reserpina, o de atenuar el efecto hiperlocomotor de sustancias como la Anfetamina (Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002).

Por el contrario, el bloqueo de estos receptores con antagonistas selectivos como el SR141716A produce hiperlocomoción. Sólo utilizando dosis bajas de algunos agonistas CB₁ se han podido evidenciar efectos estimuladores, pero la mayor parte de los autores asumen que la activación de los receptores CB₁ conlleva un marcado efecto hipoquinético. No obstante, se debe mencionar que existen variaciones en cuanto a la magnitud y/o la duración de los efectos de los distintos tipos de cannabinoides vegetales, sintéticos o endógenos, variaciones que están relacionadas con sus diferencias en cuanto a afinidad por los receptores, potencia farmacológica y/o estabilidad metabólica.

TABLA 8.1

Efectos más representativos a nivel motor de diferentes tipos de sustancias activas sobre el sistema endocannabinoide en animales de experimentación (ver referencias en Fernández-Ruiz y cols., 2002).

Compuestos		Efectos motores
Cannabinoides vegetales	Δ^9 -tetrahidrocannabinol	↓ Actividad espontánea y estereotipada en ratas. ↑ Inactividad en ratas. ↑ Hipoquinesia inducida por reserpina en ratas. ↓ Hiperactividad inducida por anfetamina en ratas. Deterioro del control motor fino en ratas. Inducción de catalepsia en ratones. ↑ Actividad motora a dosis bajas.
	Cannabinol y cannabidiol	Producen inhibición motora aunque de menor magnitud.
Cannabinoides sintéticos	CP55,940 y WIN55,212-2	Marcada inhibición motora en ratas. Inducción de rotaciones a dosis bajas en ratones.
Endocannabinoides (también análogos sintéticos)	Anandamida	Inmovilidad en ratas. ↓ Estereotipias en ratas. ↓ Actividad espontánea en ratas. ↑ Catalepsia inducida por muscimol en ratas. Inducción de rotaciones a dosis bajas en ratones.
	Metanandamida	↑ Inactividad en ratas. ↓ Actividad espontánea y estereotipias en ratas.
Inhibidores de la recaptación	AM404, UCM707 y VDM11	↓ Actividad espontánea y ↑ inactividad en ratas.
Antagonistas de los receptores	SR141716A	Bloquea los efectos motores de los agonistas CB ₁ . Produce estereotipias e hiperlocomoción.

8.2.2. Los cannabinoides alteran la actividad de ciertos neurotransmisores a nivel de los ganglios basales

Los efectos motores provocados por la activación de los receptores CB₁ con los diferentes tipos de cannabinoides vegetales, sintéticos o endógenos, que se han descrito en el apartado anterior, son el resultado de la capacidad de estas sustancias de interferir en la actividad de los tres principales neurotransmisores implicados en la funcionalidad de los ganglios basales, es decir, dopamina, GABA y glutamato. En el circuito de los ganglios basales:

- La dopamina aparece como neurotransmisor en las neuronas que van de la substantia nigra al cuerpo estriado y cuya disfunción origina la enfermedad de Parkinson (Blandini y cols., 2000).
- El GABA lo hace principalmente en las neuronas estriatales que proyectan hacia la substantia nigra y el núcleo entopeduncular (vía directa), o hacia el globo pálido (vía indirecta), y cuya disfunción origina la enfermedad de Huntington u otras patologías con alteraciones coreicas (Reddy y cols., 1999)

- El glutamato es el neurotransmisor utilizado tanto por las aferencias que, desde la corteza alcanzan el cuerpo estriado, así como por las neuronas subtalámiconigrales que aparecen hiperactivadas en la enfermedad de Parkinson e hipofuncionales en el corea de Huntington (Blandini *y cols.*, 1996).

TABLA 8.2

Efectos más representativos sobre la actividad de dopamina, GABA y glutamato, a nivel de los ganglios basales, de diferentes tipos de sustancias activas sobre el sistema endocannabinoide en animales de experimentación (ver referencias en Fernández-Ruiz y cols., 2002).

Neurotransmisor	Sistema neuronal	Efectos neuroquímicos
<i>Dopamina</i>	Neuronas nigroestriatales	↓ Receptores D ₁ y D ₂ en el estriado por agonistas CB ₁ . ↓ actividad de TH por agonistas CB ₁ . Efectos sobre la generación de potenciales de acción de agonistas o antagonistas CB ₁ .
<i>GABA</i>	Neuronas de proyección estriatal	Reducción de los efectos hipoquinéticos causados por los cannabinoides con antagonistas GABA-B. ↓ Recaptación de GABA en el globo pálido y en la sustancia nigra por agonistas CB ₁ . No hay efectos sobre la síntesis de GABA por agonistas CB ₁ . Efectos controvertidos sobre la liberación de GABA. Reducción de la actividad GABAérgica por antagonistas CB ₁ .
<i>Glutamato</i>	Aferentes corticoestriatales y neuronas subtalámiconigrales	Inhibición de la liberación de glutamato en la sustancia nigra y en el estriado por agonistas CB ₁ .

En la Tabla 8.2 se recogen, a modo de resumen, los efectos más relevantes producidos por los cannabinoides sobre la actividad de estos neurotransmisores en los ganglios basales (Sañudo-Peña *y cols.*, 1999; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002). Se puede decir que, en general, los cannabinoides producen efectos directos a nivel presináptico sobre GABA y glutamato (Maneuf *y cols.*, 1996; Romero *y cols.*, 1998a; Szabo *y cols.*, 2000), mientras que sus efectos sobre dopamina son más bien indirectos y afectan sobre todo a la síntesis de este neurotransmisor (Romero *y cols.*, 1995). Esto es consecuencia de la localización de los receptores CB₁ sobre terminales axónicos de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatal o de las neuronas glutamatérgicas subtalámiconigrales (ver Figura 8.1), pero no sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, aunque la interacción de los cannabinoides con dopamina puede realizarse a nivel postsináptico ya que los receptores CB₁ se colocan sobre las neuronas GABAérgicas estriato-eferentes con los receptores D₁ y D₂ (Meschler y Howlett, 2001). En relación al GABA y a pesar de algunos datos contradictorios, se ha descrito que los cannabinoides incrementan la liberación y/o disminuyen la recaptación de este neurotransmisor en el globo pálido y en la sustancia nigra, elevando

por tanto, su presencia en la sinapsis e incrementando la acción GABAérgica, lo que sería compatible con los efectos hipoquinéticos de los cannabinoides ya que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio (Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002). También se ha visto que este efecto es mediado por receptores GABA-B pero no por receptores GABA-A como indican los datos obtenidos en experimentos realizados con antagonistas selectivos de estos receptores (Romero *y cols.*, 1996). En relación al glutamato, hay un consenso general de que los cannabinoides inhiben la liberación de este neurotransmisor excitatorio a nivel de los ganglios basales lo que también tendría concordancia con los efectos depresores a nivel motor de los cannabinoides (Szabo *y cols.*, 2000; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002).

8.2.3. Presencia de elementos del sistema endocannabinoide en los ganglios basales

Otra de las evidencias a favor de que la actividad endocannabinoide juega un papel en el control de la actividad motora es la importante presencia, en cantidad y calidad, de elementos de este sistema, principalmente de los receptores CB₁ y de sus ligandos endógenos, en las diferentes estructuras que forman los ganglios basales, lo que explica el porqué de los marcados efectos motores de los agonistas CB₁. Como se ha mencionado antes, los receptores CB₁ están localizados en este circuito sobre dos grupos de neuronas (ver Figura 8.1):

- las neuronas que proyectan desde el estriado a la substantia nigra pars reticulata, núcleo entopeduncular y globo pálido, neuronas que son GABAérgicas y que además expresan otros marcadores como proencefalina o sustancia P,
- las neuronas que van del núcleo subtalámico a la substantia nigra pars reticulata, que utilizan glutamato como neurotransmisor.

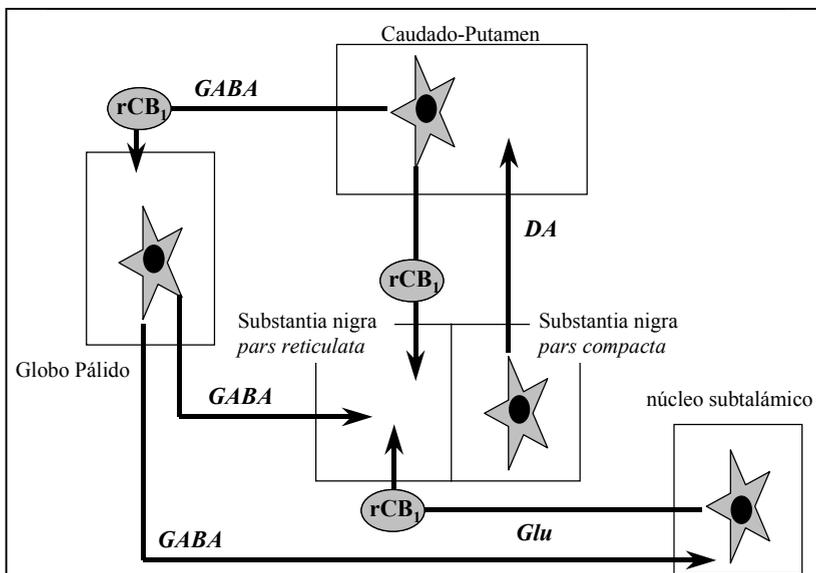


Figura 8.1. Localización del receptor para cannabinoides en los ganglios basales.

Según esta distribución, sólo se detectaría ARN mensajero para el receptor CB₁ en el cuerpo estriado y en el núcleo subtalámico (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992), mientras que en los núcleos que reciben terminales de estos dos grupos de neuronas, es decir, la *substantia nigra pars reticulata*, el globo pálido y el núcleo entopeduncular, se puede detectar una alta densidad de receptores, localizados siempre de forma presináptica (Herkenham *y cols.*, 1991), lo que está en clara concordancia con los efectos que se ha descrito que la activación de estos receptores produce sobre la liberación y/o recaptación de ambos neurotransmisores (ver apartado anterior).

En relación a la presencia de ligandos endocannabinoides en las estructuras motoras, puede decirse que también están presentes en concentraciones superiores a las que se miden en otras regiones cerebrales, siendo particularmente abundante en dos estructuras, el globo pálido y la *substantia nigra* (Bisogno *y cols.*, 1999; Di Marzo *y cols.*, 2000), estructuras que juegan un papel clave en el control del movimiento. En estas dos estructuras, también se ha podido medir una alta actividad de la FAAH, la enzima que degrada la anandamida y que siempre se encuentra muy próxima a la localización de los receptores CB₁ (Tsou *y cols.*, 1998). Respecto al transportador de endocannabinoides, que junto con la enzima FAAH, juega un papel crucial en el proceso de finalización de la acción biológica de los endocannabinoides, se sospecha que está presente en los ganglios basales de forma abundante ya que inhibidores de este proceso, como el AM404, el VDM11 o el UCM707, producen una marcada inhibición motora (ver revisión en López-Rodríguez *y cols.*, 2002). Sin embargo, no se dispone de buenas herramientas todavía para el estudio de la distribución del transportador lo que ha limitado hasta ahora el estudio de su presencia y función en los ganglios basales.

8.3. Posibilidades terapéuticas del sistema endocannabinoide en el tratamiento de los trastornos motores

Como la mayor parte de los sistemas de neurotransmisión, también la actividad endocannabinoide se ve afectada por el envejecimiento fisiológico. Esto ocurre sobre todo a nivel de los ganglios basales (Romero *y cols.*, 1998b), lo que podría relacionarse con algunas de las alteraciones motoras que se observan habitualmente en los ancianos. Sin embargo, estos cambios tienen que ser calificados de muy leves si se comparan con lo que sucede en el caso de las enfermedades neurodegenerativas que afectan directa o indirectamente al control motor (Glass *y cols.*, 2001). El análisis de tejido postmortem de enfermos con corea de Huntington (Glass *y cols.*, 2000), enfermedad de Parkinson (Lastres-Becker *y cols.*, 2001a) o enfermedad de Alzheimer (Westlake *y cols.*, 1994), ha demostrado que existen importantes alteraciones a nivel de los receptores CB₁ en los ganglios basales. Estudios realizados con modelos genéticos o con lesiones selectivas en roedores o primates no-humanos han corroborado estos resultados (Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002).

A partir de todo este conjunto de datos, se están consolidando las bases para sugerir el tipo de efectos farmacológicos que los cannabinoides podrían proporcionar para el tratamiento del deterioro motor que aparece en estas patologías (Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002), así como se están explicando, en algunos casos, los datos, generalmente de

tipo anecdótico, que sugerían un posible beneficio de los cannabinoides en pacientes, como los enfermos de esclerosis múltiple, que se automedicaban con estas sustancias. Discutiremos a continuación los datos para cada patología.

TABLA 8.3.

Alteraciones de la actividad endocannabinoide en los ganglios basales en el envejecimiento fisiológico o en algunas enfermedades neurológicas que afectan directa o indirectamente a la funcionalidad de los ganglios basales (ver referencias en Fernández-Ruiz y cols., 2002).

Enfermedad	Especies y modelos	Alteraciones de la actividad endocannabinoide
<i>Envejecimiento fisiológico</i>	Humanos	↓ con la edad de los efectos psicomotores de la marihuana.
	Ratas	↓ de los receptores CB ₁ en los ganglios basales.
<i>Enfermedad de Parkinson</i>	Humanos	↑ de los receptores CB ₁ en el núcleo caudado y en el putamen.
	Primates tratados con MPTP	↑ de los receptores CB ₁ en diferentes estructuras de los ganglios basales (efecto revertido por el tratamiento crónico con L-DOPA).
	Ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina	↑ de los niveles de ARNm para el receptor CB ₁ en el caudado-putamen, pero sin cambios en la densidad de estos receptores.
	Ratas reserpinizadas	↑ de los niveles de endocannabinoides en los ganglios basales. ↓ de los niveles de ARNm para el receptor CB ₁ en el caudado-putamen.
<i>Corea de Huntington</i>	Humanos	↓ marcada y temprana de los receptores CB ₁ en los ganglios basales.
	Ratas lesionadas con ácido 3-nitropropiónico	↓ marcada de los receptores CB ₁ en los ganglios basales en paralelo a una profunda degeneración del cuerpo estriado. ↓ de los contenidos de endocannabinoides en el estriado.
	Ratones transgénicos	↓ de los receptores CB ₁ en los ganglios basales en ausencia de muerte celular.
<i>Enfermedad de Alzheimer</i>	Humanos	↓ de los receptores CB ₁ en los ganglios basales y en otras regiones.
<i>Esclerosis múltiple</i>	Roedores con EAE	cambios a nivel de la densidad, ARNm y activación de los receptores CB ₁ en el caudado-putamen. ↑ de los niveles de endocannabinoides en el cerebro y la médula espinal.

8.3.1. Corea de Huntington

La enfermedad de Huntington es un desorden motor neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por:

- atrofia progresiva del estriado debido a una muerte selectiva de las proyecciones neuronales estriatales (aquellas que contienen receptores CB₁)
- un deterioro motor con patrón bifásico que va desde una fase temprana hiperquinética (movimientos coreiformes) a una fase tardía aquinética e incapacitante.

Estudios postmortem en ganglios basales de humanos han demostrado que en la enfermedad de Huntington existe una pérdida muy marcada de los receptores CB₁ en los ganglios basales (Glass *y cols.*, 2000). A priori se podría pensar que esta pérdida es un efecto secundario derivado de la degeneración de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatal que contienen el receptor CB₁. Sin embargo, se ha visto que en pacientes afectados por la enfermedad de Huntington en diferentes grados de la enfermedad, la pérdida de este receptor ocurre antes que la pérdida de receptores para otros neurotransmisores, incluso ya aparece en fases presintomáticas de la enfermedad, cuando la muerte celular es mínima (grados 0 y 1) (Glass *y cols.*, 2000). Esto ha llevado a la opinión de que la pérdida de los receptores CB₁ podría estar implicada en la propia patogénesis de la enfermedad de Huntington. Las mismas conclusiones se han alcanzado en los modelos animales de esta enfermedad como son los modelos de ratones transgénicos que expresan una forma mutada de la huntingtina, una proteína de función aún desconocida que también aparece mutada en la patología humana. En estos ratones, también se han observado pérdidas del receptor CB₁ en los ganglios basales en ausencia de muerte neuronal (Denovan-Wright y Robertson, 2000; Lastres-Becker *y cols.*, 2002a), de forma similar a lo observado en las fases más tempranas de la enfermedad humana, cuando la pérdida neuronal es mínima. También se ha visto una marcada pérdida de receptores CB₁ en los ganglios basales de ratas a las que se había inducido enfermedad de Huntington mediante la administración de ácido 3-nitropropiónico, aunque en este caso se trataría de un efecto secundario derivado de la importante muerte de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatal originadas por la toxina (Lastres-Becker *y cols.*, 2002b). Esta situación es comparable al patrón de pérdida celular que ocurre en los estados sintomáticos de la enfermedad en humanos (grados 2 a 4). Estos animales también presentan cambios en los niveles de ligandos endocannabinoides en el caudado-putamen (Lastres-Becker *y cols.*, 2001b), hecho que es compatible con la idea de que la transmisión endocannabinoide en los ganglios basales se vuelve hipofuncional en la enfermedad de Huntington, lo cual contribuye en cierto modo a la típica hiperquinesia de esta enfermedad.

Aunque a pesar de que en estas condiciones el estriado sufre una profunda pérdida neuronal, una pequeña población de receptores CB₁ parece sobrevivir a esta degeneración, representando una posible diana terapéutica para el tratamiento de la hiperquinesia en la enfermedad de Huntington, principalmente en condiciones en las cuales existe más que muerte, disfunción celular, como en la fase temprana. Estudios recientes han demostrado que agonistas directos de receptores CB₁, tal como el CP55,940, o inhibidores de la recaptación (también llamados agonistas indirectos por que ellos actúan elevando los niveles de los endocannabinoides),

tales como el AM404, son capaces de reducir la hiperquinesia y llevar a la recuperación de los déficits GABAérgicos en un modelo de ratas con enfermedad de Huntington (Lastres-Becker *y cols.*, 2002b), aunque estos resultados necesitarán ser refrendados y ampliados en posteriores estudios.

8.3.2. Enfermedad de Parkinson

Los rasgos más característicos de la sintomatología en la enfermedad de Parkinson son la bradiquinesia, el temblor y la rigidez, que son consecuencia de la progresiva degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra que conduce a una denervación del cuerpo estriado (Blandini *y cols.*, 2000). Basado en el hecho de que la actividad dopaminérgica nigroestriatal que degenera en esta enfermedad podría regular de forma negativa la expresión de los receptores CB₁, así como en el hecho de que los cannabinoides producen efectos hipoquinéticos, se ha propuesto que la actividad endocannabinoide debería estar hiperactivada en la enfermedad de Parkinson. Esto ha sido demostrado tanto en estudios de los ganglios basales postmortem de pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson (Lastres-Becker *y cols.*, 2001a), como en monolesionados con MPTP (Lastres-Becker *y cols.*, 2001a), ratas tratadas con reserpina (Di Marzo *y cols.*, 2000) o ratas con lesiones unilaterales causadas por 6-hidroxidopamina (Romero *y cols.*, 2000). Estos datos parecen explicar el escaso éxito obtenido en algunos estudios clínicos al tratar con cannabinoides vegetales o sintéticos, que se comportan como agonistas CB₁, a enfermos de Parkinson y en los que se observó más un agravamiento de la hipoquinesia característica de esta enfermedad, en lógica con el perfil hipoquinético de estas sustancias, que una mejora (Consroe, 1998). Teniendo en cuenta estos datos, Brotchie (2000) ha propuesto recientemente que serían los antagonistas de los receptores CB₁ más que los agonistas sintéticos o presentes en la *Cannabis sativa*, los compuestos que podrían proporcionar un beneficio en la enfermedad de Parkinson, por sí mismos o como coadyuvantes en la clásica terapia de reemplazo de dopamina con L-dopa para reducir o retrasar la aparición de disquinesia asociada con este tratamiento crónico. Algunos estudios recientes han examinado la capacidad del antagonista selectivo CB₁, SR141716A, para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson (ver referencias en Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002), pero los datos hasta ahora no han sido concluyentes y necesitarán ser ampliados en los próximos años.

8.3.3. Esclerosis múltiple

Una de las enfermedades neurológicas donde los cannabinoides podrían tener una prometedora acción terapéutica es la esclerosis múltiple. Esta enfermedad es un desorden de origen inmune que provoca diversas alteraciones a nivel neurológico, sobre todo a nivel motor (espasticidad, distonía, temblor y ataxia), que se producen como consecuencia de una profunda desmielinización y pérdida axonal (Rieckman y Smith, 2001). Aunque no existen datos en tejido postmortem humano acerca del estado de la transmisión endocannabinoide en esta enfermedad, algunos estudios recientes realizados en animales de experimentación han proporcionado una sólida base experimental que explicaría porqué pacientes, que se automedicaban con cannabis, experimentaban un alivio sintomático en la frecuencia de aparición e intensidad

de algunos de los síntomas, especialmente de la espasticidad y el dolor (ver referencias en Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002), a pesar de la aparición de algunos efectos no deseados. En estos estudios, se ha visto que tanto la activación de los receptores CB₁ como de los CB₂ reduce la espasticidad de ratones con esta enfermedad (Baker *y cols.*, 2000a). También originan esta reducción los inhibidores de la recaptación de endocannabinoides (Baker *y cols.*, 2000b). Este dato junto con la observación de que estos ratones tienen niveles altos de endocannabinoides en el cerebro y la médula espinal (Baker *y cols.*, 2002b) y de que el desarrollo de la enfermedad en ratas produce alteraciones de la densidad y/o activación de los receptores CB₁, circunscritas principalmente a las regiones motoras (Berrendero *y cols.*, 2001), ha sido interpretado como indicativo de que la enfermedad provoca un aumento del tono endógeno cannabinoide como un mecanismo de protección frente al daño neurológico. Basándose en todas estas evidencias, obtenidas en parte en estudios básicos y en parte en estudios preclínicos, se ha puesto en marcha de forma muy reciente un ensayo clínico en humanos con cannabinoides para estudiar la capacidad de estas sustancias para reducir algunos de los síntomas de la enfermedad (<http://www.cannabis-trial.plymouth.ac.uk/>), cuyos resultados serán determinantes en los próximos años para evaluar la eficacia de estas sustancias en esta enfermedad y en otras similares.

8.3.4. Enfermedad de Alzheimer

Como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer no es un desorden motor en su origen, aunque, junto a los síntomas más característicos de esta enfermedad que afectan a la corteza cerebral y áreas subcorticales, también pueden encontrarse alteraciones motoras que son consecuencia de alteraciones a nivel de los ganglios basales, posiblemente por una degeneración de las aferencias corticales hacia el cuerpo estriado (Mitchell, 1999). En pacientes afectados por esta enfermedad, se han observado disminuciones de los receptores CB₁ que afectan principalmente al circuito de los ganglios basales (Westlake *y cols.*, 1994). Sin embargo, es importante mencionar que estos autores relacionaron los cambios observados en los receptores CB₁ en la enfermedad de Alzheimer más con las consecuencias derivadas de la edad avanzada de sus pacientes que con las características histopatológicas específicas de esa enfermedad (Westlake *y cols.*, 1994). No existen datos en modelos animales de la enfermedad que refrenden estas observaciones obtenidas en humanos, algo que deberá ser abordado en los próximos años.

8.3.5. Otras enfermedades motoras

También hay descritos efectos farmacológicos de los cannabinoides en otras patologías motoras con menor incidencia que las anteriores como son la disquinesia tardiva, el síndrome de Gilles de la Tourette, la distonía y otras (Consroe, 1998; Fernández-Ruiz *y cols.*, 2002), aunque no se ha explorado si existen cambios en alguno(s) de los elementos (ligandos o receptores) del sistema endocannabinoide. Por ejemplo, algunos autores han establecido una posible relación entre el uso de cannabis y la incidencia de aparición de disquinesia tardiva en pacientes psicóticos que son tratados de forma crónica con neurolepticos (Zaretsky *y cols.*, 1993). También se ha

sugerido que los cannabinoides sintéticos o vegetales podrían ser útiles en el tratamiento de los tics y de las conductas obsesivo-compulsivas en pacientes con síndrome de Gilles de la Tourette (Müller-Vahl y cols., 1998). Finalmente, se han observado efectos beneficiosos de los cannabinoides en el tratamiento de la distonía tanto en humanos como en modelos genéticos de roedores con esta disfunción motora (Richter y Löscher, 1994).

8.4. Conclusiones

Los resultados presentados a lo largo de este capítulo confirman que la actividad cannabinoide endógena juega un papel importante a nivel modulador en la funcionalidad de los ganglios basales. Se han presentado todos los datos a nivel bioquímico y farmacológico que apoyan esta función, y se han sentado las bases para explicar el porqué aquellas sustancias que son activas sobre las diferentes proteínas que forman parte del sistema endocannabinoide (receptores, transportador, enzimas) pueden tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la disfunción motora en enfermedades extrapiramidales o en patologías no-motoras pero que presentan síntomas extrapiramidales. El desarrollo de nuevos estudios básicos, preclínicos y clínicos tendrá que determinar en los próximos años la importancia que tiene este nuevo sistema de modulación a nivel de los ganglios basales y las posibilidades reales de aplicación terapéutica en las enfermedades con síntomas extrapiramidales.

Bibliografía

- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW y Layward L (2000a) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*. **404**:84-87.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T y Di Marzo V (2000b) Endocannabinoids control spasticity in experimental multiple sclerosis. *FASEB J*. **15**:300-302.
- Berrendero F, Sánchez A, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, García-Merino A y Fernández-Ruiz JJ (2001) Changes in cannabinoid CB1 receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse*. **41**:195-202.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ y Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. **256**:377-380.
- Blandini F, Porter RH y Greenamyre JT (1996) Glutamate and Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol*. **12**:73-94.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C y Martignoni E (2000) Functional changes in the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol*. **62**:63-88.
- Brotchie JM (2000) The neural mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. **47**:S105-S114.
- Consroe P (1998) Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiol. Dis*. **5**:534-551.

- Denovan-Wright EM y Robertson HA (2000) Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in subset neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice. *Neuroscience*. **98**:705-713.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR y Brotchie JM (2000) Enhanced levels of endocannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J*. **14**:1432-1438.
- Fernández-Ruiz JJ, Lastres-Becker I, Cabranes A, González S y Ramos JA (2002) Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **66**:263-273.
- Glass M, Dragunow M y Faull RLM (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA-A receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*. **97**:505-519.
- Glass M (2001) The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* **25**:743-765.
- González S, Romero J, de Miguel R, Lastres-Becker I, Villanúa MA, Makriyannis A, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (1999) Extrapyramidal and neuroendocrine effects of AM404, an inhibitor of the carrier-mediated transport of anandamide. *Life Sci*. **65**:327-336.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR y Richfield EK (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*. **547**:267-264.
- Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos M, Zeng B-Y, Jenner P, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (2001a) Increased cannabinoid CB₁ receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's disease and MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.* **14**:1827-1832.
- Lastres-Becker I, Fezza F, Cebeira M, Bisogno T, Ramos JA, Milone A, Fernández-Ruiz JJ y Di Marzo V (2001b) Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport*. **12**:2125-2129.
- Lastres-Becker I, Berrendero F, Lucas JJ, Martin E, Yamamoto A, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (2002a) Loss of mRNA levels, binding and activation of GTP-binding proteins for cannabinoid CB₁ receptors in the basal ganglia of a transgenic model of Huntington's disease. *Brain Res*. **929**:236-242.
- Lastres-Becker I, Hansen HH, Berrendero F, de Miguel R, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (2002b) Alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse*. **44**:23-35.
- López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Fernández-Ruiz JJ y Ramos JA (2002) Endocannabinoid transporter inhibitors *Curr. Med. Chem.* (en prensa).
- Mailleux P y Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. **48**:655-668.
- Maneuf YP, Nash JE, Crossman AR y Brotchie JM (1996) Activation of the cannabinoid receptor by Δ^9 -tetrahydrocannabinol reduces γ -aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *Eur. J. Pharmacol.* **308**:161-164.
- Meschler JP y Howlett AC (2001) Signal transduction interactions between CB₁ cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology*. **40**:918-926.
- Mitchell SL (1999) Extrapyramidal features in Alzheimer's disease. *Age Ageing*. **28**:401-409.

- Müller-Vahl KR, Kolbe H, Schneider U y Emrich HM (1998) Cannabinoids: possible role in the pathophysiology of Gilles de la Tourette-syndrome. *Acta Psychiatr. Scand.* **98**:502-506.
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **9**:1553-1571
- Reddy PH, Williams M y Tagle DA (1999) Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci.* **22**:248-255.
- Richter A y Löscher N (1994) (+)-WIN55,212-2, a novel cannabinoid receptor agonist, exerts antidystonic effects in mutant dystonic hamsters. *Eur. J. Pharmacol.* **264**:371-377.
- Rieckmann P y Smith KJ (2001) Multiple sclerosis: more than inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* **2**:435-437.
- Romero J, de Miguel R, García-Palomero E, Fernández-Ruiz JJ y Ramos JA (1995) Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Res.* **694**:223-232.
- Romero J, García-Palomero E, Fernández-Ruiz JJ y Ramos JA (1996) Involvement of GABA-B receptors in the motor inhibition produced by agonists of brain cannabinoid receptors. *Behav. Pharmacol.* **7**:299-302.
- Romero J, de Miguel R, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (1998a) The activation of cannabinoid receptors in striatonigral neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci.* **62**:351-363.
- Romero J, Berrendero F, García-Gil L, de la Cruz P, Ramos JA y Fernández-Ruiz JJ (1998b) Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding in the basal ganglia of aged rats. *Neuroscience.* **84**:1075-1083.
- Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz JJ, de Yébenes JG y Ramos JA (2000) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci.* **66**:485-494.
- Sañudo-Peña MC, Tsou K y Walker JM (1999) Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci.* **65**:703-713.
- Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P y Pfreundtner C (2000) Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience.* **97**:89-97.
- Tsou K, Nogueron MI, Muthian S, Sañudo-Peña M, Hillard CJ, Deutsch DG y Walker JM (1998) Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* **254**:137-140.
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA y 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**:637-652.
- Zaretsky A, Rector NA, Seeman MV y Fornazzari X (1993) Current cannabis use and tardive dyskinesia. *Schizophrenia Res.* **11**:3-8.

Cannabinoides y procesos de memoria y aprendizaje

9

M. P. Viveros

9.1. Introducción

Uno de los efectos comportamentales más comúnmente informados de los cannabinoides (ingredientes activos de la marihuana) es el deterioro que estas sustancias producen en procesos de aprendizaje y memoria. Existen muchos datos en la literatura que demuestran que los cannabinoides perjudican los procesos cognitivos (aprendizaje y memoria) tanto en humanos como en primates no humanos y en roedores. Los efectos agudos de los cannabinoides sobre la memoria se cree que son debidos a sus efectos directos sobre el hipocampo, una región cerebral que parece jugar un papel importante en ciertas formas de aprendizaje y memoria y que contiene una alta densidad de receptores cannabinoides CB1. El hipocampo también podría estar implicado en las alteraciones cognitivas de más larga duración que se observan tras el uso crónico de cannabinoides. Revisaremos a continuación una serie de trabajos que apoyan estas hipótesis así como diversos estudios sobre la posible implicación de diversos neurotransmisores y otras áreas cerebrales en los efectos perjudiciales de los cannabinoides sobre aprendizaje y memoria. Finalmente abordaremos la cuestión de una posible participación del sistema endocannabinoide en los procesos fisiológicos de aprendizaje y memoria.

9.2. Estudios comportamentales

Diversos estudios comportamentales indican que existe una conexión entre los déficit de memoria mediados por cannabinoides y el deterioro de la función del hipocampo. En ciertos experimentos en humanos se ha observado que la marihuana perjudica de forma aguda la memoria a corto plazo y produce también déficit en el almacenamiento de memoria a largo plazo. El patrón de estas alteraciones de memoria causados por marihuana es similar al observado en pacientes con disfunción hipocampal inducida por diversas patologías, por ejemplo, el síndrome de Korsakoff y la

enfermedad de Alzheimer. También se ha indicado que el efecto producido por el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), uno de los principales cannabinoides psicoactivos de la marihuana, sobre el comportamiento de monos y ratas en ciertas pruebas de memoria recuerda al tipo de alteraciones producidas por lesión amigdalohipocámpal (monos) o hipocámpal (ratas) (ver para revisión Sullivan, 2000).

En ratas se han utilizado diversas pruebas de aprendizaje y memoria para estudiar los efectos de los cannabinoides. Se han descrito los efectos negativos del Δ^9 -THC en ratas que habían sido entrenadas para responder a un estímulo (un tono) condicionado. Los déficits ocasionados por el Δ^9 -THC sugieren una incapacidad para procesar y/o recordar correctamente el tono presentado (Campbell y cols., 1986). En otros experimentos se ha utilizado un laberinto radial, una prueba que mide específicamente memoria espacial, el tipo de memoria que está más claramente asociada con la función hipocámpal en ratas. La administración sistémica de los agonistas cannabinoides Δ^9 -THC, WIN 55,212-2 y CP 55,940 aumentó el número de errores cometidos en el laberinto radial. Con objeto de identificar los substratos anatómicos que median estos efectos perjudiciales de los cannabinoides, en este mismo estudio se administró el CP 55,940 dentro del hipocampo, encontrándose también en este caso una ejecución deteriorada en el laberinto. Además, los efectos del CP 55,940 intrahipocámpal fueron aparentemente específicos para los aspectos cognitivos, porque no se detectaron otros efectos farmacológicos típicos de los cannabinoides como antinocicepción, hipotermia o catalepsia (Lichtman y cols., 1995). En otro estudio se observó que el Δ^9 -THC administrado de forma aguda deterioraba la memoria en una prueba de laberinto en T y que este efecto del Δ^9 -THC era antagonizado por el antagonista selectivo del receptor CB1 SR 141716A. Además, no se observó desarrollo de tolerancia a los efectos negativos del cannabinoide tras tratamiento crónico con la droga (Nava y cols., 2001).

9.3. Efectos de los cannabinoides sobre la actividad neuronal en el hipocampo. Potenciación a largo plazo. Implicación del glutamato

Además de los efectos sobre el comportamiento, se ha observado que los cannabinoides alteran las respuestas hipocámpales a estímulos sensoriales (Campbell y cols., 1986) y hay datos que sugieren que la profunda inhibición de la actividad neuronal en ciertas regiones del hipocampo podría estar relacionada con una peor codificación de la información requerida para la correcta ejecución de ciertas pruebas de memoria (Heyser y cols., 1993; Sullivan, 2000).

El concepto de potenciación a largo plazo (PLP) refiere al aumento y facilitación de larga duración de la transmisión sináptica producida tras una estimulación breve pero de alta frecuencia. Se ha descrito en el hipocampo y otras estructuras cerebrales con alta concentración de receptores NMDA de glutamato (un aminoácido excitador). El fenómeno de PLP en el hipocampo parece estar relacionado con los procesos de memoria, particularmente con la memoria espacial. Tanto los agonistas sintéticos del receptor CB1 cannabinoide como los ligandos endógenos anandamida y 2-araquidionilglicerol (2-AG), tienen un efecto inhibitorio sobre la PLP en el hipocampo. Es decir, interfieren con un modelo "in vitro" de aprendizaje

y memoria en el cual se aplican estímulos de alta frecuencia (por ejemplo 100Hz) a fibras nerviosas que se proyectan desde el área CA3 al área CA1 (áreas hipocámpales). Este tipo de estimulación despolariza la membrana postsináptica hasta tal punto que puede activarse el receptor NMDA. La activación de este canal-receptor requiere un cierto grado de despolarización de la membrana para que el Mg^{2+} que bloquea el canal se retire por repulsión electrostática. Se ha propuesto que el efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la PLP puede estar relacionado con la capacidad de los cannabinoides de inhibir la liberación de glutamato. De esta forma, la cantidad de glutamato (transmisor excitador) liberada tras la administración de los cannabinoides sería tan baja que no sería suficiente para superar la inhibición del canal NMDA por el Mg^{2+} . De hecho, los cannabinoides no perjudican la PLP si la membrana postsináptica de la neurona se mantiene, experimentalmente, a un potencial despolarizante suficiente como para que se retire el Mg^{2+} del canal, o si en la preparación no se añade Mg^{2+} . Estos datos sugieren que el efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la PLP está relacionado con la inhibición de la liberación de glutamato a través de receptores CB1 presinápticos. Respecto a los mecanismos moleculares que puedan ser responsables de la reducción de la liberación del transmisor, se han propuesto dos posibilidades. En primer lugar, la activación del receptor CB1 provocaría la inhibición (mediada por proteína G) de canales de calcio presinápticos tipo N y P/Q implicados en la liberación de glutamato. En segundo lugar, la activación del receptor cannabinoide podría reducir la liberación del neurotransmisor mediante un efecto directo sobre la maquinaria que hace posible la liberación de vesículas que contienen el glutamato (la liberación del neurotransmisor es vesicular). En concreto, la activación del receptor cannabinoide podría causar inhibición de proteínas implicadas en el proceso de liberación vesicular (ver para revisión Ameri, 1999; Sullivan, 2000 y Schlicker y Kathmann, 2001).

9.4. Implicación de la acetilcolina

Una explicación alternativa para los efectos negativos de los cannabinoides sobre procesos cognitivos implica al sistema colinérgico septohipocámpal. Se considera que este sistema juega un papel central en la adquisición y almacenamiento de información. La interrupción anatómica o el deterioro funcional de esta vía, por ejemplo por administración tópica o sistémica del antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina escopolamina, tiene un efecto perjudicial sobre ciertos tipos de habilidades cognitivas (Dutar y cols., 1995). Hay datos que sugieren que los cannabinoides interactúan con el sistema colinérgico septohipocámpal. Así, los cannabinoides inhiben la liberación de acetilcolina en el hipocampo de rata tanto *in vitro* (Gifford y Ashby, 1996) como *in vivo* (Gessa y cols., 1997). Por contraste, la liberación de acetilcolina hipocámpal es aumentada por el antagonista CB1 SR 141716A (Gifford y Ashby, 1996; Gessa y cols., 1997) así como en ratones deficientes en receptor CB1 (Kathmann y cols., 2001). Estos datos sugieren que la actividad hipocámpal colinérgica puede mediar los efectos de los cannabinoides sobre la memoria. Un dato controvertido respecto a esta hipótesis lo ofrece un estudio en el que se encontró que el SR 141716A, pero no la fisostigmina, un

inhibidor de la acetilcolinesterasa (enzima que degrada a la acetilcolina), bloqueaba la inhibición de la memoria espacial inducida por Δ^9 -THC (Lichtman y Martin 1996). Sin embargo, en un trabajo más reciente se ha informado de que el efecto negativo sobre la memoria espacial del CP 55,940 es reducido tanto por SR 141716A como por la eptastigmina (un inhibidor de colinesterasa de segunda generación). Además la eptastigmina no afectó a otros efectos del CP 55,940 tales como analgesia o hipoactividad. Estos datos apoyan la idea de que el deterioro de memoria espacial inducido por cannabinoide es mediado por bloqueo colinérgico central (Braida y Sale 2000).

9.5. Implicación de la dopamina

Existen también numerosos datos que indican que el sistema dopaminérgico está implicado en el déficit cognitivo inducido por cannabinoides (ver para revisión Chaperon y Thiébot, 1999). Se ha encontrado recientemente que el sulpiride, un antagonista del receptor D2 de dopamina, bloqueaba tanto la inhibición de la concentración de acetilcolina hipocampal como el déficit de memoria (laberinto en T) inducidos por Δ^9 -THC. Ambos efectos del Δ^9 -THC fueron también antagonizados por el SR 141716A. Según estos resultados, el deterioro de memoria y la inhibición de la concentración de acetilcolina extracelular en el hipocampo estarían mediados por la activación concomitante de los receptores D2 dopaminérgicos y CB1 cannabinoide (Nava y cols., 2000). También se ha propuesto que durante un tratamiento crónico con Δ^9 -THC, la hiperactividad del sistema dopaminérgico en áreas límbicas y corticales podría ser responsable de los déficits de memoria persistentes que se observan durante un tratamiento crónico con Δ^9 -THC o en abusadores crónicos de marihuana (Chait y Perry 1994, Nava y cols., 2001).

9.6. Implicación de la colecistoquinina (CCK)

Hay datos que demuestran que la liberación del neuropéptido CCK en el hipocampo acompaña a la adquisición de una prueba de memoria espacial en ratas (Sebret y cols., 1999). Un estudio más reciente indica que el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 induce una fuerte inhibición de la liberación (inducida por potasio) de CCK por neuronas hipocampales (Beinfeld y Connolly 2001). Por tanto, la inhibición de la liberación de CCK mediada por el receptor CB1 en el hipocampo podría también contribuir a los defectos de aprendizaje y memoria producidos por los cannabinoides.

9.7. Implicación del glutamato en el cortex prefrontal

El cortex prefrontal es otra zona del cerebro que puede tener importancia en procesos de aprendizaje y memoria. Se ha observado recientemente que tanto el WIN 55,212-2 como el CP 55,940 inhiben la transmisión sináptica glutamatérgica

en el cortex prefrontal de ratas, mediante una acción presináptica, y que estos efectos son revertidos por el antagonista CB1 SR 141716A. También se observó que el antagonista *per se* produce el efecto contrario, un aumento significativo de la transmisión glutamatérgica. Además, mientras que los agonistas cannabinoides deterioraban la PLP en esta región cerebral, de forma análoga a lo que ocurre en el hipocampo, el SR 141716A pareció favorecerla (Auclair *y cols.* 2000).

9.8. Exposición crónica a cannabinoides y efectos sobre el hipocampo

La exposición crónica a Δ^9 -THC o a extractos de marihuana altera de forma persistente la estructura y la función del hipocampo de rata, una región paleocortical implicada en procesos de aprendizaje y memoria tanto en ratas como en humanos. Mientras que la exposición aguda (fumar) a marihuana parece causar un deterioro reversible de memoria debido a la inhibición de la transmisión glutamatérgica, colinérgica y noradrenérgica (sin excluir la posible participación de otros neurotransmisores), cabe esperar que el fumar crónicamente marihuana cause deficiencias cognitivas y de memoria persistentes. En estudios con cultivos celulares se ha demostrado que el Δ^9 -THC causa muerte neuronal y que las neuronas del hipocampo son más sensibles a la muerte inducida por Δ^9 -THC que las neuronas corticales. La neurotoxicidad por Δ^9 -THC está mediada por el receptor CB1, cuya activación parece activar factores de transcripción que pudieran alterar la expresión génica, activando la expresión de diversos genes incluido el factor α de necrosis tumoral (TNF α) que induce muerte celular por apoptosis. También hay datos que sugieren que la activación del receptor CB1 por Δ^9 -THC podría mediar la estimulación de la ruta de la ciclooxigenasa, con generación de radicales libres, lo que a su vez puede conducir a peroxidación lipídica y muerte celular. En conjunto los datos sugieren que el Δ^9 -THC induce muerte celular en el hipocampo, mediante alteración en los procesos de transcripción, lo que podría explicar el deterioro de memoria en fumadores crónicos de marihuana (ver para revisión, Ameri, 1999).

9.9. Implicación del sistema cannabinoide endógeno en los procesos fisiológicos de aprendizaje y memoria

De los datos aportados en los anteriores epígrafes parece deducirse que las alteraciones en aprendizaje y memoria producidas tanto por la marihuana como por diversos agonistas cannabinoides sintéticos se deben, al menos en parte, a que dichas sustancias, mediante la activación de receptor CB1 producen un déficit en la función del hipocampo. Una cuestión importante que se plantea a continuación, es qué implicación funcional podrían tener los cannabinoides endógenos (anandamida, 2-AG) en los procesos fisiológicos de aprendizaje y memoria. ¿Podrían los cannabinoides endógenos, en condiciones fisiológicas, ejercer una función moduladora sobre tales procesos cognitivos? ¿Podrían estar el aprendizaje y la memoria regulados por un tono cannabinoide endógeno? Utilizando el antagonista selectivo del receptor CB1, SR 141716A, se han obtenido algunos datos que parecen apoyar

esta hipótesis. Así, se ha observado que el SR 141716A potencia la liberación de acetilcolina en el hipocampo tanto *in vivo* (Gessa *y cols.*, 1997) como *in vitro* (Gifford y Ashby, 1996). También se ha informado de que el antagonista del receptor CB1 facilitó la memoria a corto plazo en una prueba de reconocimiento social (comportamiento no condicionado) en roedores, que requiere un procesamiento en el hipocampo, y además redujo el déficit de memoria en ratas y ratones viejos (Terranova *y cols.*, 1996). Sin embargo, otros estudios más recientes indican que el SR 141716A no afectó la ejecución de ratas en diversas tareas de aprendizaje y memoria basadas en el condicionamiento. Estos resultados indican que la efectividad del bloqueo del receptor CB1 para mejorar la memoria puede depender del tipo de *test*. Es posible que sólo ciertos procedimientos experimentales puedan disparar una activación tónica de receptores cannabinoides implicados en procesos de memoria (ver para revisión Chaperon y Thiébot, 1999). Otro estudio en monos sugiere que altas dosis de SR 141716A puede perjudicar la adquisición de aprendizaje y potenciar los efectos perjudiciales que induce la escopolamina sobre los procesos de adquisición (Nakamura-Palacios *y cols.*, 2000). Estos resultados aparentemente contradictorios indican que los protocolos específicos utilizados en cada trabajo, así como las dosis de SR 141716A empleadas son factores importantes. Otra cuestión que debe tenerse en cuenta es que el SR 141716A, además de actuar como antagonista del receptor CB1, también parece poder actuar como agonista inverso sobre estos receptores (Sullivan, 2000). La disponibilidad de un antagonista puro (silencioso) del receptor CB1 podría contribuir a una mejor identificación de la función del sistema cannabinoide endógeno en los procesos de aprendizaje y memoria. Otra herramienta útil para estudiar la implicación fisiológica del sistema endocannabinoide en procesos de aprendizaje y memoria la constituyen los ratones genéticamente modificados (*knockout*) deficientes en receptor CB1. Los ratones deficientes en receptor CB1 muestran una PLP aumentada (Bohme *y cols.*, 2000), así como una mejor retención de memoria en un *test* de reconocimiento de objetos (Reibaud *y cols.* 1999). Además, muestran un aumento significativo en las respuestas condicionadas producidas en un modelo de evitación activa, lo que también sugiere una mejora en los procesos de aprendizaje y memoria (Martín *y cols.*, 2002). Por tanto, estos estudios con ratones deficientes en receptor CB1 apoyan la hipótesis de que en condiciones fisiológicas está presente un tono cannabinoide endógeno que está implicado en la modulación de los procesos de aprendizaje y memoria. En su conjunto, los datos discutidos en esta última sección sugieren que el bloqueo de los receptores CB1 puede jugar un papel importante en la consolidación de la memoria a corto plazo. Podría pensarse en la existencia de un tono agonista cannabinoide endógeno (presumiblemente mediado por anandamida) que estuviera implicado en el olvido espontáneo y en el deterioro de la memoria asociado con la edad (Terranova *y cols.* 1996, Chaperon y Thiebot, 1999). Desde un punto de vista especulativo cabe pensar que un funcionamiento equilibrado del sistema cannabinoide endógeno, en interacción con otros sistemas neuroquímicos implicados en la regulación de los procesos cognitivos, pudiera contribuir a la “selección de la información relevante” para una mejor eficacia de los procesos de aprendizaje y memoria. Posibles disfunciones de estos sistemas pudieran estar implicados en el déficit cognitivo asociado con la edad. Finalmente, la distorsión

de estos sistemas, particularmente en el hipocampo y quizá en otras áreas cerebrales, producida por el cannabis, explicaría el deterioro en los procesos cognitivos producidos por esta droga.

Bibliografía

- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* **58**:315-348.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P y Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **83**:3287-3293.
- Beinfeld MC y Connolly K (2001) Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neurosci. Lett.* **301**:69-71.
- Bohme GA, Laville M, Ledent C, Parmentier M y Imperato A (2000) Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience.* **95**:5-7.
- Braida D y Sala M (2000) Cannabinoid-induced working memory impairment is reversed by a second generation cholinesterase inhibitor in rats. *Neuroreport.* **11**:2025-2029.
- Campbell KA, Foster TC, Hampson RE y Deadwyler SA (1986) Δ -9-tetrahydrocannabinol differentially affects sensory-evoked potentials in the rat dentate gyrus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**:936-940.
- Chaperon F y Thiébot M-H (1999) Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit. Rev. Neurobiol.* **13**:243-281.
- Chait LD y Perry JL (1994) Acute and residual effects of alcohol and marijuana, alone and in combination, on mood and performance. *Psychopharmacology.* **115**:340-349.
- Dutar P, Bassant MH, Senut MC y Lamour Y (1995) The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol. Rev.* **75**:393-427.
- Gessa GL, Mascia MS, Casu MA y Carta G (1997) Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur. J. Pharmacol.* **327**:R1-R2.
- Gifford AN y Ashby CR Jr (1996) Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist SR 141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**:1431-1436.
- Heyser CJ, Hampson RE y Deadwyler SA (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.
- Kathmann M, Weber B, Zimmer A y Schlicker E (2001) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus of cannabinoid CB1 receptor-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* **132**:1169-1173.
- Lichtman AH, Dimen KR y Martin BR (1995) Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology.* **119**:282-290.
- Lichtman AH y Martin BR (1996) Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology.* **126**: 125-131.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R y Valverde O (2002) Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology.* **159**:379-387.

- Nakamura-Palacios EM, Winsauer PJ y Moerschbaeche JM (2000) Effects of the cannabinoid ligand SR 141716A alone or in combination with delta-9-tetrahydrocannabinol or scopolamine on learning in squirrel monkeys. *Behav. Pharmacol.* **11**:377-386.
- Nava F, Carta G, Battasi AM y Gessa GL (2000) D₂ dopamine receptors enable Δ⁹-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *Br. J. Pharmacol.* **130**:1201-1210.
- Nava F, Carta G, Colombo G y Gessa GL (2001) Effects of chronic Δ⁹-tetrahydrocannabinol treatment on hippocampal extracellular acetylcholine concentration and alternation performance in the T-maze. *Neuropharmacology.* **41**:392-399.
- Reibaud M, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Böhme GA y Imperato A (1999) Enhancement of memory in cannabinoid CB₁ receptor knock-out mice. *Eur J. Pharmacol.* **379**:R1-R2.
- Schlicker E y Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *TIPS.* **22**:565-572.
- Sebret A, Lena I, Crete D, Matsui T, Roques BP y Dauge V (1999) Rat hippocampal neurons are critically involved in physiological improvement of memory processes induced by cholecystokinin-B receptor stimulation. *J. Neurosci.* **19**:7230-7237.
- Sullivan JM (2000) Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn. Mem.* **7**:132-139.
- Terranova JP, Storme JJ, Lafon N, Perio A, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G y Soubrie P (1996) Improvement of memory in rodents by the selective CB₁ cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology.* **126**:165-172.

Acciones de los cannabinoides sobre el sistema inmunitario

10

A. Arévalo-Martín, E. Molina-Holgado y C. Guaza

10.1. Introducción

La relación entre los cannabinoides, y la funcionalidad del sistema inmunológico se comenzó a estudiar a partir de la década de 1970, cuando se postulaba que el consumo de marihuana se relacionaba con un aumento de la susceptibilidad a desarrollar infecciones virales y con una potenciación de los episodios de alergia. Los estudios posteriores con animales de experimentación sobre su potencial acción inmunosupresora confirmaron que los cannabinoides reducían la capacidad de defensa inmunológica del organismo. Hoy se sabe que la capacidad inmunomoduladora de los cannabinoides tiene lugar principalmente a través de sus acciones en receptores específicos presentes en las membranas de las células inmunológicas. No obstante, algunas acciones de estos compuestos parecen no estar mediadas por receptor, y una explicación de cómo estarían actuando los cannabinoides puede encontrarse en su naturaleza lipofílica, que les posibilitaría para poder afectar la fluidez de las membranas. Dada la enorme complejidad del sistema inmunitario, el estudio de los mecanismos de acción de los cannabinoides resulta complicado puesto que prácticamente todas las subpoblaciones de células inmunológicas son diana de las acciones de los cannabinoides, y las diferentes subpoblaciones modulan su actividad unas sobre otras. Además, nuevas evidencias experimentales están modificando la visión global de qué sucede en la inmunosupresión, lo que complica más aún el estudio. En cualquier caso, investigar las acciones de los cannabinoides sobre el sistema inmunitario es de gran interés, tanto por aumentar nuestra comprensión sobre la modulación de la respuesta inmunológica como por su potencial uso terapéutico en enfermedades autoinmunes y en procesos de inflamación crónica.

El término cannabinoides engloba tanto a compuestos naturales (presentes en *C. sativa*), como a compuestos sintéticos y también endógenos (producidos por nuestro organismo). El principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) que fue aislado en 1964 por Gaoni y

Mechoulam y que, al igual que todos los cannabinoides, es una molécula altamente lipofílica. El conocimiento de la estructura del THC favoreció la investigación inicial sobre la farmacología y función de los cannabinoides. Posteriormente, se identificaron y caracterizaron receptores específicos cannabinoides (Devane *y cols.*, 1988; Matsuda *y cols.*, 1990) y se descubrieron sus ligandos endógenos: anandamida, 2-araquidonil-glicerol, palmitoiletanolamida y noladin éter (Devane *y cols.*, 1992; Mechoulam *y cols.*, 1995). Por tanto se estableció la existencia de un sistema cannabinoide endógeno lo que ha impulsado enormemente la investigación en este área para tratar de comprender su función fisiológica. Así, aunque se tienen evidencias de la existencia de nuevos subtipos de receptores, dos son los receptores clonados y caracterizados hasta el momento: el receptor CB1 localizado fundamentalmente en estructuras del SNC y el receptor CB2 expresado principalmente en células del sistema inmunológico. Por otro lado, estudios basados en la estructura molecular del THC han contribuido a la identificación de las características estructurales requeridas para que los cannabinoides se unan a estos receptores y ejerzan sus acciones por medio de ellos, lo que ha conducido a la síntesis de agonistas y antagonistas selectivos de los receptores CB1 y CB2. Además, el conocimiento de los mecanismos de inactivación de los endocannabinoides, nos ha permitido empezar a dibujar algunas de las funciones fisiológicas de los mismos (Giuffrida *y cols.*, 2001).

Aunque los cannabinoides se han conocido popularmente por sus efectos psicoactivos, hoy sabemos que modulan entre otras, la actividad motora, los procesos de memoria, la nocicepción, la ingesta de alimentos y la reactividad inmunitaria. El objetivo de este capítulo es presentar las evidencias experimentales más significativas sobre la función de los cannabinoides a nivel del sistema inmunitario.

10.2. Función y distribución de los receptores cannabinoides en la homeostasis inmunitaria

Dado que el sistema inmunológico se compone de muchos subtipos celulares distintos y que la funcionalidad inmunitaria se controla por una gran cantidad de mecanismos reguladores no se entrará en la bioquímica de las vías de señalización utilizadas por los cannabinoides para modular la función de las células inmunológicas, sino que se dará una visión más funcional de estos compuestos y de sus consecuencias fisiológicas. En un principio los efectos de los cannabinoides sobre el sistema inmune no se creían mediados por receptor ya que la expresión del receptor CB1 es mayoritaria en el SNC y aún no se había identificado el receptor CB2. Este receptor fue aislado de bazo de rata y la clonación del mismo se consiguió a partir de una línea promielocítica humana (Munro *y cols.*, 1993). El receptor CB2 comparte el 44% de homología en la secuencia de aminoácidos con el receptor CB1 y, ambos presentan la estructura de siete dominios transmembrana característica de los receptores acoplados a proteínas G. El nivel de expresión del receptor CB2 en el sistema inmunológico es de 10 a 100 veces superior a la del CB1, por lo que se le considera el receptor cannabinoide más importante en la fisiología del sistema inmune. Esto no implica que no se haya de considerar la implicación del receptor CB1 en algunas de las

acciones de los cannabinoides sobre el sistema inmune. El análisis de la expresión del receptor CB2 en los diferentes componentes celulares del sistema inmune, interesantemente, muestra una importante similitud en su distribución en el caso del hombre y del ratón. Como se observa en la Tabla 10.1, la mayor expresión se da en linfocitos B y células NK, pero también está presente el receptor CB2 en monocitos, neutrófilos, linfocitos T y mastocitos. El significado fisiológico de la presencia del receptor CB2 en prácticamente todas las células inmunológicas está empezando a clarificarse. Si se hace un repaso a la literatura científica, vemos que se han descrito acciones muy diversas de los cannabinoides sobre la reactividad inmunológica, algunas de las cuales se describirán a continuación.

TABLA 10.1

<p>EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CB2 EN SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS HUMANOS</p> <p>Células B>NK>Monocitos>Neutrófilos> Células T CD8+>Células T CD4+</p> <p>EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CB2 EN SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS EN RATÓN</p> <p>Células B>Macrófagos>Células T</p> <p>Diferente expresión en función del estado de activación de la célula</p>

Los linfocitos T son las principales células reguladoras de la defensa del organismo frente a infecciones virales y microbiales. El efectos de los cannabinoides sobre las respuestas de los linfocitos T ha sido controvertido durante largo tiempo. Así, algunos estudios realizados con linfocitos de sangre periférica obtenidos de fumadores de marihuana, mostraron una disminución en la capacidad proliferativa de los linfocitos, mientras en otros no se observaron variaciones significativas. Otra respuesta clásica que sirve para evaluar la función de los linfocitos T es la formación de rosetas tras la inmunización con eritrocitos de carnero. Atendiendo a los resultados en esta prueba, linfocitos obtenidos de consumidores crónicos de hachís mostraban un impedimento de la respuesta tras la inmunización, pero otras pruebas inmunológicas aparecían normales. El consumo de marihuana también se ha asociado con un aumento en el porcentaje sanguíneo de linfocitos T colaboradores o CD4+ en relación con los linfocitos T citotóxicos o CD8+, pero en ningún caso existe una demostración contundente de que la funcionalidad inmunológica se mantuviera fuera de los límites normales. Por tanto, se puede sugerir que el consumo de marihuana induce algunas alteraciones en la función de los linfocitos T, aunque la magnitud de los cambios no es lo suficientemente potente para que la consideremos responsable de la disminución de la resistencia a la infección (Klein *y cols.*, 1998; Parolaro 1999). Otra

visión más homogénea la presentan los resultados *in vitro* que utilizan cultivos de linfocitos expuestos a la acción directa de los cannabinoides. En este caso, si hay consenso en los hallazgos, de manera que los cannabinoides a dosis altas disminuyen la proliferación de linfocitos, mientras que a bajas dosis lo que se produce es un aumento en la capacidad proliferativa.

Otras observaciones respecto a las interacciones de los cannabinoides sobre el sistema inmune se refieren a los linfocitos B, las células responsables de la producción de anticuerpos, (inmunoglobulinas). Así, se ha descrito una disminución en los niveles sanguíneos de las inmunoglobulinas G (IgG), y un aumento en la concentración de los subtipos IgD e IgE en consumidores de cannabis. Otros estudios han mostrado que los cannabinoides pueden suprimir las respuestas proliferativas de los linfocitos B a la estimulación con endotoxina bacteriana (LPS). Sin embargo, utilizando linfocitos B obtenidos de tejido amigdalario, que es muy abundante en receptores CB2, se observa un incremento en la tasa proliferativa tras el tratamiento con agonistas cannabinoides.

Los macrófagos son células de la estirpe monocítica fundamentales en las respuestas inmunológicas ya que son las encargadas de fagocitar, destruir y procesar elementos extraños (como bacterias) para presentarlos a los linfocitos T CD4+, que como ya se ha comentado son los principales reguladores de la reactividad inmunitaria. Los primeros estudios realizados sobre los efectos de los cannabinoides en la función de los macrófagos se realizaron con células obtenidas de los alveolos pulmonares de fumadores de marihuana, y se valoró la capacidad fagocítica y metabólica de las mismas, observándose cambios poco significativos. Sin embargo, los resultados obtenidos en macrófagos peritoneales y líneas celulares en cultivo, son extremadamente consistentes y muestran una inhibición de la función del macrófago al disminuir la quimiotaxis (migración hacia el tejido donde está teniendo lugar la respuesta inmune), la fagocitosis, la expresión de mediadores inflamatorios, la capacidad de citólisis (destrucción de células extrañas), y la presentación de antígenos. En los procesos inflamatorios resulta especialmente interesante la modulación por cannabinoides de la producción de metabolitos del ácido araquidónico por macrófagos, siendo este efecto dependiente de receptor CB1. Los macrófagos peritoneales presentan sitios de unión específicos y saturables y que unen THC con alta afinidad, produciendo la activación de fosfolipasas y finalmente generando eicosanoides. Por otro lado, tanto los macrófagos activados como otras células inmunológicas son capaces de liberar el cannabinoide endógeno anandamida, como consecuencia de la movilización del ácido araquidónico, permitiendo por tanto la posibilidad de una regulación local inmunitaria del sistema cannabinoide endógeno.

Los cannabinoides afectan también a la producción por macrófagos de óxido nítrico (al que se le ha implicado en diversas patologías inflamatorias) tras la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa II en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios. Se ha descrito una supresión de la producción de NO por THC añadido a cultivos de macrófagos murinos peritoneales, pero también se han observado efectos contrarios, es decir, aumentos en la liberación de NO utilizando cultivos de monocitos humanos. La implicación o no del receptor cannabinoide CB2 en los efectos observados en la generación de NO es todavía materia de debate, ya que hay datos a favor y en contra.

Quizá uno de los hallazgos más significativos en relación con la relevancia del papel de los cannabinoides como moduladores de la fisiología del sistema inmunitario, es el hecho de que la expresión de los receptores cannabinoides, viene determinada por el estadio de diferenciación y por el grado de activación de la célula, y por tanto con la función celular (Lee *y cols.*, 2001). Esto podría significar que el producto génico que codifica el receptor cannabinoide podría transcribirse como parte del programa de activación celular inmune, y podría conferir al sistema cannabinoide un significado no conocido por el momento.

Que la activación del receptor CB2 regula la función inmune se ha confirmado plenamente por los resultados con ratones con delección del gen que codifica para dicho receptor, ya que desaparecen las acciones inmunomoduladoras, mientras que permanecen las funciones relacionadas con la actividad del receptor CB1.

Respecto a la validez de los estudios *in vitro*, en el sentido de poder extrapolar los resultados a la situación del organismo *in vivo*, se debe señalar que las dosis de cannabinoides efectivas en la supresión de la actividad inmune son al menos 10 veces mayores que la concentración medida en sangre de fumadores de marihuana.

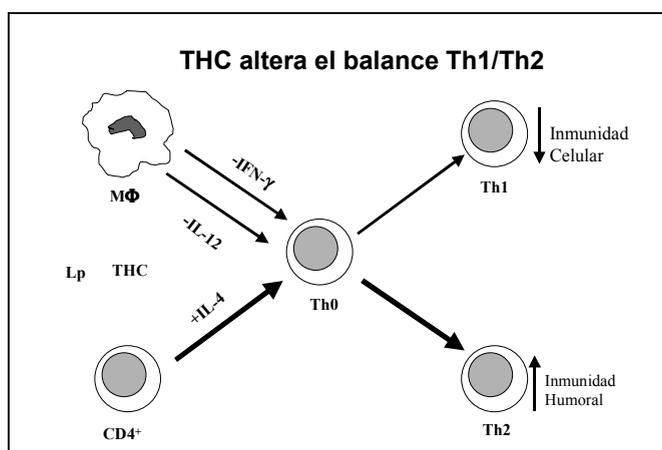


Figura 10.1. Efectos del THC en el balance de citoquinas del fenotipo Th1 y Th2. La administración de THC suprime la respuesta inmunitaria a la infección con *Legionella pneumophila* (Lp) a través i) de la disminución de la producción de IL-12 e IFN- γ por tanto de la inhibición de la inmunidad celular y ii) del incremento en la producción de IL-4. En estas acciones del THC están involucrados los dos tipos de receptor cannabinoide CB1 y CB2.

10.3. Acciones de cannabinoides sobre la red de citoquinas

Las citoquinas, proteínas solubles producidas por diferentes células inmunitarias activadas, juegan un importante papel en la regulación de la respuesta inmune. Todas las citoquinas funcionan a muy bajas concentraciones a través de receptores específicos compuestos por varias subunidades, a veces compartidas por distintas citoquinas lo que explica que la función biológica de unas citoquinas solape

a menudo con la de otras. Los cambios en la producción de citoquinas de la fase aguda por los macrófagos pueden estar relacionados con los efectos de los cannabinoides en la inmunidad antimicrobial. Así, el THC aumentó *in vivo* la movilización de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α en sangre en respuesta a la infección con *Legionella pneumophila* incrementando de manera notable la mortalidad. Sin embargo, la adición de THC a macrófagos activados en cultivo disminuyó la producción de TNF- α . Hoy sabemos que uno de los mecanismos involucrados en la supresión por cannabinoides de la resistencia a infecciones oportunistas, del tipo de la *Legionella*, es la alteración en el balance de la producción por los linfocitos T cooperadores de citoquinas determinantes del fenotipo Th1, asociadas a los procesos de inmunidad celular, como IL-2; IFN- γ y TNF- α frente a citoquinas del fenotipo Th2 asociadas a procesos de inmunidad humoral como IL-4 e IL-10 (Klein y cols., 2000). Así que el THC disminuye la producción de citoquinas asociadas al fenotipo Th1 como IFN- γ y la IL-12, y aumenta la producción de citoquinas asociadas al fenotipo Th2 como la IL-4. Por tanto, los cannabinoides aumentarían la inmunidad celular y disminuirían la inmunidad humoral (Figura 10.1). Es decir, lo que es nocivo para hacer frente a una infección puntual, caso de la *Legionella*, puede ser positivo en la alteraciones autoinmunes y en aquellas situaciones de inflamación aguda y crónica en las cuales una disminución de las citoquinas proinflamatorias (tipo Th1) junto con un aumento de las anti-inflamatorias (tipo Th2) resulta beneficioso. En apoyo de esta hipótesis, evidencias recientes muestran los efectos beneficiosos de los cannabinoides en modelos experimentales de inflamación aguda (Conti y cols., 2002) y crónica como la artritis reumatoide (Malfait y cols., 2000) o en el caso de la diabetes autoinmune (Li y cols., 2001). El tipo de regulación ejercida por los cannabinoides sobre la red de citoquinas parece ser dependiente del grado de activación celular, como lo indica el hecho de que el cannabinoide aumenta la liberación de IL-2 en situaciones de activación subóptima y la disminuye en los casos de activación máxima en linfocitos de bazo (Jan y cols., 2001). Por otro lado, es importante tener en cuenta que las acciones de los cannabinoides sobre la red de citoquinas pueden ser vitales no sólo a nivel del propio sistema inmune, sino también en múltiples patologías del sistema nervioso central (SNC) que cursan con alteraciones en la barrera hematoencefálica y con procesos de inflamación. En esta línea los cannabinoides ejercen acciones en células gliales del SNC, que expresan los receptores CB1 y CB2, y modifican la liberación de citoquinas, como el TNF- α , importante mediador del daño neuronal y oligodendroglial en condiciones neuroinflamatorias/neurodegenerativas. Las observaciones descritas en microglía y astrogía, los dos tipos gliales más relacionados con la respuesta inmune intracerebral no aclaran que subtipo de receptor (CB1 o CB2) está implicado en los efectos de los cannabinoides, incluso se hipotetiza sobre la implicación de un tercer tipo de receptor cannabinoide. En cualquier caso, el cannabinoide endógeno anandamida, inhibe la producción de NO y de TNF- α , y aumenta la producción de IL-6 en astrocitos de ratón infectados con el virus de Theiler o estimulados con LPS (Molina-Holgado y cols., 1999 y 2002). De igual modo, en microglía (los macrófagos residentes del cerebro) la adición de agonistas cannabinoides disminuyó la generación de NO y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (ver Figura 10.2). Estas acciones anti-inflamatorias de los cannabinoides podrían ser, en parte, la base

de sus efectos beneficiosos en enfermedades autoinmunes del SNC como la esclerosis múltiple.

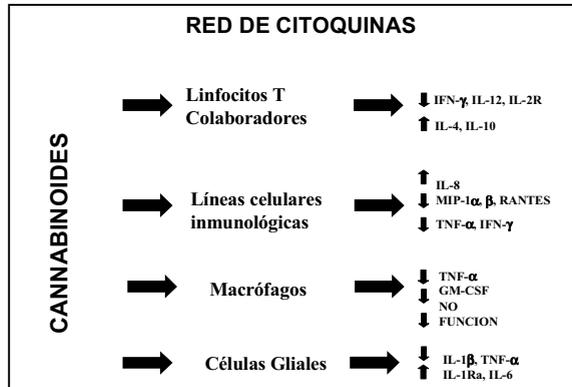


Figura 10.2. Resumen de las acciones ejercidas por los cannabinoides sobre distintos tipo celulares en relación con la producción de citoquinas.

Así pues, el descubrimiento y posterior elucidación del sistema cannabinoide endógeno en el sistema inmunitario ha puesto de manifiesto que los cannabinoides pueden tener un importante potencial terapéutico en aquellas enfermedades con un componente inmunológico, además de incidir en las capacidades defensivas del individuo frente a la agresión patógena externa. Por lo tanto, los cannabinoides se nos descubren como moléculas con un gran interés por su potencial terapéutico que solo una investigación rigurosa, llevada a cabo con cautela, podrá arrojar luz sobre las esperanzadoras expectativas que se nos presentan.

Bibliografía

- Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D y Giagnoni G (2002) Anti-inflammatory action of endocannabinoid palmitylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **181**:187.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS y Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* **34**:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A y Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor *Science.* **258**:1946-1949.
- Gaoni Y y Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**:1646-1647.
- Giuffrida A, Beltramo M y Piomelli D (2001) Mechanisms of endocannabinoid inactivation: Biochemistry and Pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **298**:7-14.
- Jan TR y Kaminski NE (2001) Role of mitogen-activated protein kinases in the differential regulation of interleukin-2 by cannabinol. *J. Leukoc Biol.* **69**:841-849.
- Klein TW, Lane B, Newton C y Friedman H (2000a) The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Med.* **225**:1-8

- Klein TW, Newton C y Friedman H (1998) Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol. Today*. **19**:373-381.
- Klein TW, Newton CA, Nakachi N y Friedman H (2000b) Delta-9-tetrahydrocannabinol suppresses immunity and early IFN- γ , IL-12, and IL-12 receptor β 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *J. Immunol.* **164**:6461-6466.
- Lee SF, Newton C, Widen R, Friedman H y Klein TW (2001) Differential expression of cannabinoid CB2 receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* **423**:235-241.
- Li X, Kaminski NE y Fischer LJ (2001) Examination of the immunosuppressive effect of delta 9-tetrahydrocannabinol in streptozotin-induced autoimmune diabetes. *Int. Immunopharmacol.* **1**:699-712.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik S, Andreakos E, Mechoulam R y Feldman M (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **17**:9561-9566.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC y Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* **346**:561-564.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR y Compton DR (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**:83-90.
- Molina-Holgado E, Guaza C, Borrell J y Molina-Holgado F (1999). Effects of cannabinoids on the immune system and central nervous system: therapeutic implications. *BioDrugs.* **12**:317-326.
- Molina-Holgado F, Molina-Holgado E y Guaza C (1998) The endogenous cannabinoid anandamide potentiates IL-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway *FEBS Lett.* **433**:139-142.
- Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C y Rothwell NJ (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**:829-836
- Munro S, Thomas KL y Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* **365**:61-65.
- Parolaro D (1999) Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Sci.* **65**:637-644.

Control de la decisión supervivencia/ muerte celular por cannabinoides

11

M. Guzmán

11.1. Introducción

Las posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides constituyen un tema de amplio debate científico y social. En la actualidad ya se permite a los médicos de algunos países, entre ellos Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Irlanda y (desde mayo de 2001) España, prescribir determinados cannabinoides (Marinol® y/o Cesamet®) como estimulantes del apetito e inhibidores de la náusea y el vómito en pacientes de sida o cáncer tratados crónicamente con quimioterapia (Voth y Schwartz, 1997; Pertwee, 2000). Entre otros usos terapéuticos potenciales de los cannabinoides, cuyo estudio se encuentra hoy en día en distintas fases de investigación preclínica y clínica, podríamos quizás destacar la analgesia (Iversen y Chapman, 2002) y el tratamiento de trastornos del movimiento asociados a enfermedades neurodegenerativas (Piomelli y cols., 2000; <http://www.cannabis-trial.plymouth.ac.uk>). Durante los últimos años se ha demostrado que los cannabinoides son capaces además de prevenir o inducir la muerte de determinados tipos de células, dos caras de una misma moneda que podrían hacer de estos compuestos agentes citoprotectores o citostáticos con interés terapéutico. En este capítulo se resume el estado actual de las investigaciones llevadas a cabo por nuestro laboratorio y otros grupos sobre esta propiedad de los cannabinoides, con especial énfasis en el efecto antiproliferativo en células nerviosas. Los efectos de los cannabinoides sobre la supervivencia y función de células inmunes y otras células no nerviosas se recogen en dos revisiones recientes (Di Marzo y cols., 2000; Guzmán y cols., 2001a).

11.2. Neuroprotección

Diversas investigaciones en sistemas de cultivo celular indican que los cannabinoides pueden proteger a las neuronas frente a determinados estímulos tóxicos tales como la sobre-estimulación glutamatérgica (Skaper y cols., 1996) y el daño oxidativo

(Hampson *y cols.*, 1998). De hecho, estudios *in vivo* han confirmado esta acción neuroprotectora de los cannabinoides y la implicación del receptor CB₁ en ella. Así, el cannabinoide sintético WIN-55,212-2 es capaz de disminuir la neurotoxicidad en un modelo de isquemia cerebral (Nagayama *y cols.* 1999). Un efecto similar ha sido mostrado para el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal componente activo de la marihuana, en un modelo de excitotoxicidad inducido por ouabaína (van der Stelt *y cols.*, 2001a). Ambos efectos eran prevenidos por SR141716, un antagonista selectivo del receptor CB₁. Los endocannabinoides anandamida y 2-araquidonoilglicerol ejercen también un papel neuroprotector *in vivo* en modelos de daño cerebral por excitotoxicidad o trauma mecánico, respectivamente (van der Stelt *y cols.* 2001b; Panikashvili *y cols.*, 2001). Además, como ocurre en los procesos de lesión cerebral, la síntesis de endocannabinoides se activa por un aumento en la concentración citoplasmática de Ca²⁺, lo que podría ejercer una función neuroprotectora (Piomelli *y cols.*, 2000; Hansen *y cols.*, 2001). Todos estos hallazgos han conducido a la propuesta de que una de las funciones biológicas más relevantes del sistema endocannabinoide sería la neuroprotectora (Piomelli *y cols.*, 2000; Porter y Felder, 2001; Mechoulam *y cols.*, 2002). Un compuesto relacionado estructural aunque no funcionalmente con los cannabinoides, el dextranabinol (HU-211), se encuentra en la actualidad en Fase III para el tratamiento del daño cerebral traumático (<http://www.pharmoscorp.com>).

El mecanismo preciso de la acción neuroprotectora de los cannabinoides no es aún del todo conocido. Los cannabinoides desempeñan un papel neuromodulador como mensajeros retrógrados inhibiendo presinápticamente los canales de Ca²⁺ sensibles a potencial y con ello la liberación de diversos neurotransmisores (Wilson y Nicoll, 2001), entre ellos el glutamato, que cuando se produce en exceso posee efectos neurotóxicos bien demostrados (Piomelli *y cols.*, 2000; Schlicker y Kathman, 2001). Aparte de este efecto sobre las propias neuronas, los cannabinoides podrían ser neuroprotectores por su propia naturaleza antioxidante (Hampson *y cols.*, 1998) o por sus acciones sobre las células de glía, que modulan la función neuronal en el cerebro. Entre estas últimas acciones podríamos destacar la inhibición de la producción de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias, el bloqueo de la señalización de Ca²⁺ a través de las uniones en hendidura, y el aumento en el aporte de nutrientes a las neuronas (Guzmán *y cols.*, 2001a), así como el propio efecto “glioprotector” de los cannabinoides que se menciona a continuación.

11.3. Glioprotección

A diferencia de lo que ocurre en las células tumorales de glía (ver más adelante), la viabilidad de astrocitos en cultivo no se ve afectada por cannabinoides (Sánchez *y cols.*, 1998). Este comportamiento diferencial de células gliales transformadas y no transformadas podría residir en la capacidad que poseen las primeras pero no las segundas de sintetizar *de novo* un esfingolípido bioactivo, la ceramida, en respuesta a cannabinoides. De acuerdo con ello, los astrocitos sufren apoptosis cuando la síntesis *de novo* de ceramida se induce selectivamente en estas células por ciertos fármacos (Guzmán *y cols.*, 2001b). En estudios preliminares nuestro

grupo ha observado que los cannabinoides rescatan a los astrocitos en cultivo de apoptosis inducida por ceramida, efecto que depende de la activación del receptor CB₁ (Gómez del Pulgar *y cols.*, datos no publicados). En suma, aunque todavía es preciso llevar a cabo estudios más exhaustivos al respecto, nuestra hipótesis de trabajo es que, al proteger a los astrocitos de muerte, los cannabinoides podrían favorecer la acción neuroprotectora de estas células.

11.4. Muerte de células nerviosas tumorales

Diversos cannabinoides, tanto naturales como sintéticos, inducen la muerte por un proceso de apoptosis (“muerte celular programada”) de células transformadas de origen glial (glioma C6; Sánchez *y cols.*, 1998) y neuronal (neuroblastoma CHP100; Macarrone *y cols.*, 2000) en cultivo. Además, en relación con lo que se ha comentado anteriormente, este efecto de los cannabinoides no implica una mera acción tóxica generalizada, ya que es bastante selectiva de células tumorales. Es más, nuestro grupo describió hace un par de años el poder antitumoral de los cannabinoides sobre gliomas en ratas y ratones (Galve-Roperh *y cols.*, 2000). En estos experimentos inoculamos células de glioma directamente en el cerebro de ratas. Todos y cada uno de los animales que se dejaron sin tratar con cannabinoides murieron 12-18 días después de la inoculación de las células. Para evaluar el potencial antitumoral de los cannabinoides, 12 días después de la inoculación de las células se administró a dos grupos de animales durante 7 días THC o WIN-55,212-2 a través de una cánula localizada en el sitio de inoculación de las células tumorales. Una tercera parte de los animales tratados con cannabinoides tuvieron una vida significativamente más larga que los animales control, y los cannabinoides erradicaron completamente el tumor en otra tercera parte de los animales. En la otra tercera parte la terapia no funcionó. Los animales curados con cannabinoides continuaron su vida con normalidad, no observándose recurrencia alguna del tumor.

Algunas compuestos antitumorales que se ensayan en roedores ejercen sus efectos antiproliferativos no directamente sobre las células tumorales, sino induciendo en el animal una respuesta inmune que es en última instancia la que detiene el crecimiento del tumor. Para discernir si la acción antiproliferativa de los cannabinoides se debía a un efecto directo sobre las células tumorales o a un efecto indirecto mediado por una respuesta inmune, se inocularon células de glioma en ratones inmunodeficientes. Observamos que el tamaño de los tumores era bastante inferior en los animales tratados durante 7 días con THC o WIN-55,212-2 que en los animales control. Esto indica que el efecto antiproliferativo de los cannabinoides se ejerce directamente sobre el tumor (Galve-Roperh *y cols.*, 2000).

Se examinaron a continuación los posibles efectos secundarios del tratamiento con cannabinoides. Al igual que en los animales antes mencionados cuyos tumores fueron erradicados con cannabinoides, el análisis minucioso por resonancia magnética de todos los animales sin tumor revelaba que el tratamiento con cannabinoides no producía ninguna señal de daño por necrosis, edema, infección, inflamación o trauma. Para descartar la posibilidad de que los cannabinoides fueran tóxicos para las células nerviosas no tumorales, se realizaron tinciones histológicas específicas que demostraron que estos compuestos no producían ningún efecto

apoptótico generalizado en el cerebro, sino únicamente en las células transformadas. Así mismo, en los análisis de sangre los parámetros bioquímicos y los marcadores de daño tisular no resultaron afectados ni a lo largo del periodo de 7 días de administración ni hasta 2 meses después de la finalización del tratamiento con cannabinoides (Galve-Roperh *y cols.*, 2000).

11.5. ¿Cannabinoides como agentes antitumorales?

Dentro de los tumores cerebrales que afectan a los seres humanos, los gliomas son los más frecuentes (1-2 por 50.000 personas y año), malignos (mortalidad cercana al 100%) y de evolución más rápida (esperanza de vida de meses tras su diagnóstico). Hoy en día, el tratamiento de los gliomas es meramente paliativo, e implica técnicas tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia (Holland, 2000; Maher *y cols.*, 2001). Además, la terapia génica ha comenzado a ser empleada como tratamiento experimental de los gliomas, aunque hasta ahora ha proporcionado escasos resultados positivos (Holland, 2000). Nuestros estudios comentados anteriormente sugieren que los cannabinoides podrían emplearse en terapias combinadas junto con la cirugía y la radioterapia en el tratamiento experimental de los tumores cerebrales. Ahora bien, está claro que quedan aún muchas cuestiones por resolver, entre ellas las que se plantean a continuación.

¿Por qué mecanismo se produce la acción antitumoral de los cannabinoides? Hemos observado que la acción apoptótica de los cannabinoides sobre células de glioma en cultivo parece deberse a la generación de ceramida y a la activación de una cascada de señalización intracelular, la de proteína quinasas activadas por mitógenos ERK (Galve-Roperh *y cols.*, 2000). Sin embargo, estudios más recientes indican que *in vivo* la situación es más compleja. En concreto, los cannabinoides parecen bloquear el crecimiento tumoral no sólo por el mecanismo antes mencionado sino también inhibiendo la angiogénesis, esto es, el proceso de formación de vasos sanguíneos necesario para la correcta nutrición y crecimiento del tumor (Blázquez *y cols.*, datos no publicados).

¿Podrían mitigarse los efectos psicoactivos de los cannabinoides en una terapia antitumoral? Es en principio deseable que las terapias basadas en la utilización de cannabinoides carezcan de efectos psicoactivos colaterales. Como se ha comentado en otros capítulos, existen dos subtipos de receptores de cannabinoides, el “central” o CB₁, localizado principalmente en el cerebro y responsable de la psicoactividad, y el “periférico” o CB₂, localizado principalmente en el sistema inmune y no ligado a psicoactividad. Nuestros estudios han demostrado que el receptor CB₂ se expresa abundantemente (aunque por causas todavía desconocidas) en gliomas, y que su activación selectiva con el agonista sintético JWH-133 conduce a la regresión de estos tumores en ratones sin efectos psicoactivos colaterales (Sánchez *y cols.*, 2001). Este receptor podría constituir por tanto una interesante diana terapéutica.

¿Es aplicable la terapia a humanos? Los protocolos a cumplir para pasar de estudios preclínicos a una fase clínica son bastante complejos. La Agencia Española del Medicamento dio luz verde en Noviembre de 2001 a un ensayo clínico piloto para estudiar el efecto del THC en la recidiva de los gliomas. Sin embargo, quedan

todavía bastantes trámites burocráticos que resolver para que dicho ensayo pueda comenzar. Muchas terapias experimentales funcionan en roedores pero no en pacientes. Las ratas poseen sistemas inmune, de detoxificación y de regeneración tisular mucho más potentes que los humanos. De hecho, las estadísticas son claras: la inmensa mayoría de los agentes antitumorales potenciales no superan las dos primeras fases de ensayos clínicos. En suma, hasta que la terapia no se experimente en humanos no será posible validar los cannabinoides como posibles agentes antitumorales.

¿Curarían los porros los tumores cerebrales? Existe hoy en día debate sobre la posible utilización terapéutica de los cigarrillos de marihuana, lo que se ha venido en llamar “porro terapéutico”. Mi punto de vista personal es que en ciertas situaciones no se pueden negar efectos terapéuticos a los porros, si bien en general la inhalatoria no es la vía deseada de administración de un fármaco. Así mismo, la presencia de componentes distintos al THC en la planta puede modular (para bien o para mal) la acción de éste. Ahora bien, en el caso de su efecto antitumoral los cannabinoides han sido aplicados directamente en la zona del tumor, mientras que cuando se fuma un porro cabe esperar que sólo una pequeñísima parte de los principios activos de la planta penetre en el cerebro y llegue al tumor. Además, el WIN-55,212-2 y el JWH-133 han exhibido una potencia mayor que el THC en nuestro sistema experimental, y no debe olvidarse que la aplicación sistémica de cannabinoides puede inducir un efecto inmunosupresor que debilite el rechazo de tumores por el organismo hospedador, como de hecho se ha demostrado en algún caso (Zhu *y cols.*, 2000).

¿Pueden inhibir los cannabinoides el crecimiento de otros tumores? Es probable que sí. Los cannabinoides también detienen *in vitro* el crecimiento de células tumorales de mama y próstata, por poner dos ejemplos (Di Marzo *y cols.*, 2000; Guzmán *y cols.*, 2001a), e inducen *in vivo* la regresión de adenocarcinomas de pulmón (Munson *y cols.*, 1975), epitelomas de tiroides (Bifulco *y cols.*, 2001) y carcinomas de piel (Casanova *y cols.*, datos no publicados). Sin embargo, estos sistemas deben caracterizarse aún más a fondo.

En suma, sólo el tiempo dirá si es posible una terapia antitumoral con cannabinoides.

Bibliografía

- Bifulco M *y cols.* (2001) Control by the endogenous cannabinoid system of *ras* oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J.* **15**:2745-2747.
- Di Marzo V *y cols.* (2000) Endocannabinoids and fatty acid amides in cancer, inflammation and related disorders. *Chem. Phys. Lipids.* **108**:191-209.
- Galve-Roperh I *y cols.* (2000) Antitumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Med.* **6**:313-319.
- Guzmán M *y cols.* (2001a) Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J. Mol. Med.* **78**:613-625.
- Guzmán M *y cols.* (2001b) Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**:19-22.

- Hampson AJ *y cols.* (1998) Cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:8268-8273.
- Hansen HH *y cols.* (2001) Accumulation of the anandamide precursor and other *N*-acylethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death. *J. Neurochem.* **76**:39-46.
- Holland EC (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:6242-6244.
- Iversen L *y Chapman V* (2002) Cannabinoids: a real prospect for pain relief. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**:50-55.
- Maccarrone M *y cols.* (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J. Biol. Chem.* **275**:31938-31945.
- Maher EA *y cols.* (2001) Malignant glioma: genetic and biology of a grave matter. *Genes Dev.* **15**:1311-1333.
- Mechoulam R *y cols.* (2002) Cannabinoid and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* **8**:58-61.
- Munson AE *y cols.* (1975) Antineoplastic activity of cannabinoids. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**:597-602.
- Nagayama T *y cols.* (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* **19**:2987-2985.
- Panikashvili D *y cols.* (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.* **413**:527-531.
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* **9**:1-19.
- Piomelli D *y cols.* (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**:218-224.
- Porter AC *y Felder CC* (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **90**:45-60.
- Sánchez C *y cols.* (1998) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* **436**:6-10.
- Sánchez C *y cols.*, (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor. *Cancer Res.* **61**:5784-5789.
- Schlicker E *y Kathmann M* (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 565-572.
- Skaper SD *y cols.* (1996) The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3984-3989.
- Van der Stelt M *y cols.* (2001a) Neuroprotection by Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the main active compound of marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J. Neurosci.* **21**:6475-6479.
- Van der Stelt M *y cols.* (2001b) Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J. Neurosci.* **21**:8765-8771.
- Voth E *y Schwartz R* (1997) Medicinal applications of delta-9-tetrahydrocannabinol and marijuana. *Ann. Intern. Med.* **126**:791-798.
- Wilson RI *y Nicoll RA* (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature.* **410**:588-592.
- Zhu LX *y cols.* (2000) Δ -9-Tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB₂ receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. *J. Immunol.* **165**:373-380.



**Los cannabinoides
como drogas de abuso**

Tolerancia y dependencia de cannabinoides

12

R. Maldonado

12.1. Introducción

Los derivados de *Cannabis sativa*, tales como la marihuana y el hashish, son el grupo de drogas ilícitas que presenta un mayor consumo en humanos. Dichas preparaciones contienen un elevado número de sustancias psicoactivas de entre las cuales cabe destacar el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). Sin embargo, el potencial adictivo en humanos de estos preparados continua siendo un tema controvertido. Diversos autores han sugerido que los derivados de *Cannabis sativa* no inducen dependencia física en humanos, mientras que otros han descrito la aparición de ciertos signos de abstinencia en consumidores de preparaciones particularmente ricas en principios activos (Hollister, 1986; Haney y cols., 1999). Las escasas reseñas referentes a estos cuadros de abstinencia sugieren que deben ser suaves y difíciles de observar en consumidores de cannabis. No obstante, los derivados de cannabis producen claros efectos subjetivos en el individuo que conducen a una búsqueda y consumo de la droga. Los procesos implicados en los fenómenos de drogodependencia son complejos tanto desde un punto de vista neurobiológico como conductual. Un primer indicativo de dichos procesos está representado por el desarrollo de los fenómenos de tolerancia y de dependencia física que aparecen como consecuencia de la adaptación del organismo, y en particular del sistema nervioso central, a la presencia continuada de la droga. Sin embargo, no debemos olvidar que estos fenómenos de tolerancia y de dependencia tan solo constituyen un aspecto parcial de las capacidades adictivas de una sustancia. Un punto importante en común de todas las drogas de abuso es su capacidad para inducir efectos reforzantes (motivacionales positivos) que son de suma importancia para inducir el comportamiento de búsqueda y consumo de una droga. Diversos estudios han sido realizados sobre todo en animales de experimentación para estudiar el posible desarrollo de tolerancia y dependencia cannabinoide así como los efectos reforzantes de dichas sustancias. Este capítulo estará centrado en los estudios que han permitido definir la capacidad de los cannabinoides para inducir fenómenos de tolerancia y de dependencia así como los mecanismos neurobiológicos implicados en dichos fenómenos.

12.2. Fenómenos de tolerancia a los cannabinoides

12.2.1. Tolerancia cannabinoide en el animal de experimentación

La administración crónica de diferentes agonistas cannabinoides desarrolla un fenómeno de tolerancia a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas tal y como se ha demostrado en estudios realizados en diferentes especies animales: ratones, ratas, palomas, perros y monos (Abood y Martin, 1992). Estos estudios han demostrado la aparición de tolerancia a los efectos inducidos por los cannabinoides sobre las respuestas al dolor, actividad locomotora, control de la motricidad, temperatura corporal, respuestas cognitivas, motilidad gastrointestinal, evolución del peso corporal, función cardiovascular, actividad anticonvulsivante y respuestas endocrinas (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002). El desarrollo de la tolerancia cannabinoide es particularmente rápido en estos modelos animales y una importante disminución del efecto farmacológico ya fue observada tras la segunda administración de una dosis elevada de cannabinoide (Abood y Martin, 1992; Hutcheson *y cols.*, 1998). El máximo grado de tolerancia cannabinoide se obtiene también con cierta rapidez durante la administración crónica de estos compuestos (Bass y Martin, 2000).

Diversos estudios han demostrado la presencia de una tolerancia cruzada entre diferentes agonistas cannabinoides exógenos que afecta a acciones farmacológicas tales como analgesia, hipolocomoción e hipotermia (Pertwee *y cols.*, 1993). Sin embargo, se han descrito resultados contradictorios referentes a la posible existencia de una tolerancia cruzada entre cannabinoides exógenos y el cannabinoide endógeno anandamida (Pertwee *y cols.*, 1993; Welch, 1997).

12.2.2. Mecanismos implicados en la tolerancia cannabinoide

12.2.2.1. Participación de mecanismos farmacocinéticos

Diversos mecanismos de tipo farmacocinético han sido sugeridos que pudieran participar en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide, tales como cambios en la absorción, distribución, biotransformación y excreción de estos compuestos. Sin embargo el papel desempeñado por el conjunto de estos mecanismos farmacocinéticos parece muy secundario o incluso inexistente (Martin *y cols.*, 1976).

12.2.2.2. Participación de mecanismos farmacodinámicos que afectan al sistema cannabinoide endógeno

Diversas modificaciones farmacodinámicas que afectan la expresión, características de fijación y actividad funcional de los receptores cannabinoides CB-1 desempeñan un papel importante en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide. En este sentido, el número total de receptores cannabinoides CB-1 (B_{max}) disminuyó en diversas estructuras cerebrales, incluyendo estriado, sistema límbico, córtex y cerebelo, durante la administración crónica de agonistas cannabinoides (Rodríguez de Fonseca *y cols.*, 1994; Fan *y cols.*, 1996; Rubino *y cols.*, 1998; 2000b). Los niveles de RNAm que codi-

fica el receptor cannabinoide CB-1 también resultaron disminuidos en diversas áreas del sistema nervioso central durante el tratamiento crónico con cannabinoides, sobre todo en la porción anterior del cerebro (Rubino *y cols.*, 1994; Romero *y cols.*, 1998a). Esta disminución en la densidad y expresión de los receptores cannabinoides CB-1 parece jugar un papel importante en el desarrollo de la tolerancia. Sin embargo, otros estudios no han encontrado cambios en el número de receptores CB-1 ni en sus niveles de RNAm durante la administración crónica de THC (Abood *y cols.*, 1993), e incluso se ha descrito un incremento de la densidad de receptores CB-1 (Romero *y cols.*, 1995) y de la expresión de su RNAm (Zhuang *y cols.*, 1998) a nivel del hipocampo y del cerebelo.

La administración crónica de cannabinoides también modifica la expresión y la actividad funcional de las proteínas G, las cuales se encuentran funcionalmente acopladas a los receptores cannabinoides. Así, la administración crónica de cannabinoides produjo una disminución de los niveles de RNAm que codifica para las proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_s$ en un amplio número de estructuras cerebrales, así como una reducción más localizada de las proteínas $G\alpha_o$. A pesar de esta alteración en la expresión génica de las subunidades α de las proteínas G, no se observaron modificaciones en la cantidad total de estas proteínas (Rubino *y cols.*, 1997). Se ha postulado que los cambios observados en la expresión de las proteínas G están relacionados con un fenómeno de desensibilización de los receptores cannabinoides CB-1. En este sentido, una disminución de un marcador de actividad de las proteínas G, la fijación de [35 S]GTP γ S tras administración de un agonista cannabinoide, ha sido observada en un amplio número de estructuras cerebrales en animales que han recibido un tratamiento crónico con cannabinoides (Sim *y cols.*, 1996). Un fenómeno similar de desensibilización de los receptores cannabinoides, reflejado por una disminución de la fijación de [35 S]GTP γ S ha sido descrito durante la tolerancia inducida por la administración crónica de anandamida (Rubino *y cols.*, 2000a).

La duración temporal de los cambios bioquímicos inducidos por la administración crónica de cannabinoides es muy corta, en acuerdo con la corta duración del fenómeno de tolerancia cannabinoide (Bass y Martin, 2000). La mayor parte de los cambios inducidos a nivel de la expresión del RNAm que codifica por los receptores cannabinoides CB-1 y las subunidades α de las proteínas G vuelven a sus niveles basales transcurridas unas pocas horas tras el cese del tratamiento con cannabinoides. Así, tan solo la expresión de las subunidades $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ permaneció todavía disminuida una hora después del cese del tratamiento, pero volvieron a los niveles basales 96 y 24 horas más tarde, respectivamente (Rubino *y cols.*, 1998). Los cambios observados a nivel de los receptores cannabinoides CB-1 también resultaron reversibles, incluso cuando los animales recibieron el tratamiento con cannabinoides durante un largo período de tiempo (tres meses en ratas y siete meses en monos) (Westlake *y cols.*, 1991).

12.2.2.3. Participación de mecanismos farmacodinámicos que afectan al sistema opioide endógeno

La participación del sistema opioide endógeno en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide fue en primer lugar sugerida por la existencia de una tolerancia

cruzada entre compuestos de naturaleza opioide y cannabinoide. Así, la administración crónica de THC induce tolerancia a los efectos analgésicos (Kaymakcalan y Deneau, 1972; Hine, 1985) y cardiovasculares (Hine 1985) de la morfina. Sin embargo, no todos los estudios observaron esta tolerancia cruzada tras la administración repetida de THC (Martin *y cols.*, 1994). La administración crónica de morfina también desarrolla tolerancia a los efectos analgésicos inducidos por el THC (Bloom y Dewey, 1978; Hine, 1985), aunque esta forma de tolerancia cruzada tampoco fue siempre observada (Mao *y cols.*, 2000), e incluso una potencialización de la analgesia cannabinoide ha sido descrita en animales tolerantes a la morfina (Melvin *y cols.*, 1993). Una tolerancia cruzada en sentido bidireccional también ha sido descrita entre agonistas cannabinoideos y agonistas selectivos de los receptores opioides kappa (Welch, 1997). Por otra parte, la administración de oligonucleótidos antisentido que bloquean la expresión de los receptores opioides kappa incrementó la tolerancia inducida por la administración crónica de THC (Rowen *y cols.*, 1998). El desarrollo de tolerancia al cannabinoide endógeno anandamida parece implicar mecanismos diferentes de aquellos que participan en el desarrollo de tolerancia a los cannabinoideos exógenos. Así, los animales tolerantes a la anandamida no mostraron tolerancia cruzada a las respuestas analgésicas inducidas por agonistas opioides mu, delta y kappa, mientras que los animales tolerantes al THC mostraron una tolerancia cruzada con los agonistas opioides kappa en condiciones experimentales similares (Welch, 1997).

La reciente utilización de animales modificados genéticamente en los que se ha suprimido la expresión de determinados componentes del sistema opioide endógeno (ratones knockout) ha permitido aportar nuevos datos para clarificar los mecanismos implicados en la tolerancia cannabinoide. La tolerancia a la actividad analgésica y a los efectos motores del THC resultó disminuida en ratones knockout en los que se suprimió el gen que codifica el precursor de las encefalinas endógenas, la pre-proencefalina. Sin embargo, el desarrollo de la tolerancia a la acción hipotérmica del THC no resultó modificada en estos ratones knockout (Valverde *y cols.*, 2000). El desarrollo de la tolerancia a las diferentes respuestas farmacológicas del THC no resultó modificada en ratones knockout deficientes en el gen que codifica el precursor de las dinorfinas endógenas, la prodinorfina (Zimmer *y cols.*, 2001), ni en ratones deficientes en receptores opioides mu o delta (Ghozland *y cols.*, 2002). Los ratones knockout deficientes en receptores opioides kappa mostraron una ligera disminución de la tolerancia a los efectos motores del THC, pero desarrollaron el mismo grado de tolerancia a los efectos analgésicos e hipotérmicos (Ghozland *y cols.*, 2002). En conclusión, la supresión de un único receptor opioide no tiene consecuencias relevantes sobre el desarrollo de la tolerancia cannabinoide. Sin embargo, péptidos opioides derivados de la pre-proencefalina parecen desarrollar un papel importante en el desarrollo de la tolerancia a la actividad analgésica del THC.

12.2.3. Tolerancia cannabinoide en humanos

Diversos estudios clínicos también han demostrado el desarrollo de tolerancia a diversas acciones farmacológicas del THC en humanos (Compton *y cols.*, 1990; Haney *y cols.*, 1997). En este sentido, se ha demostrado que el consumo repetido de

THC da lugar a una disminución de sus efectos subjetivos, cardiovasculares y de sus acciones sobre la presión intraocular y la actividad electroencefalográfica (Gibbins y cols., 1976; Jaffe, 1990). El desarrollo de tolerancia a los efectos del THC en humanos se encuentra directamente relacionado con la cantidad de THC consumida, observándose un mayor grado de tolerancia en los grandes consumidores (Jones, 1978). Los estudios realizados en animales de experimentación han identificado diferentes mecanismos farmacodinámicos, que afectan principalmente a los sistemas cannabinoide y opioide endógeno, como responsables del desarrollo de la tolerancia cannabinoide. Estos mismos mecanismos farmacodinámicos podrían ser responsables de la aparición de la tolerancia a los efectos del THC en humanos. Sin embargo, es importante destacar que las dosis de THC y de otros agonistas cannabinoideos usadas en el animal de experimentación son muy superiores a las consumidas habitualmente por humanos. En efecto, la cantidad de principios activos en las preparaciones de *Cannabis sativa* es bastante variable, pero el consumo de un cigarrillo de marihuana puede representar una dosis de aproximadamente 30-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para un sujeto de unos 70 kg de peso (Tanda y cols., 2000). Las dosis utilizadas para desarrollar la tolerancia a los efectos del THC en animales, principalmente en roedores, suelen ser bastante elevadas y oscilan en torno a 20-50 mg/kg diarios. Dicha dosis podría ser equivalente a un consumo diario de 300 a 1,500 cigarrillos de marihuana. Considerando la relación directa que existe entre la dosis de THC y el desarrollo de la tolerancia (Jones y cols., 1978), el grado de tolerancia obtenido en estas condiciones experimentales en el animal resultaría difícil de alcanzar en las condiciones de consumo humano. Sin embargo estos estudios en el animal de experimentación son importantes para comprender los cambios adaptativos que se producen a nivel neurobiológico durante la exposición crónica a cannabinoideos.

12.3. Fenómenos de dependencia física de cannabinoideos

12.3.1. Dependencia física de cannabinoideos en el animal de experimentación

La aparición de manifestaciones somáticas de un síndrome de abstinencia espontáneo tras el cese del tratamiento crónico con THC no ha podido ser observada en diferentes especies animales (ratón, rata, paloma, perro y mono) ni siquiera tras la administración de dosis sumamente elevadas (McMillan y cols., 1970; Harris y cols., 1974; Diana y cols., 1998; Aceto y cols., 2001). Ciertos estudios antiguos han descrito la aparición de determinadas manifestaciones de abstinencia espontánea tras el cese de una administración crónica de THC por vía intravenosa en perros (Kaymakcalan, 1973) y monos (Deneau y Kaymakcalan, 1971). Sin embargo, estudios posteriores han puesto en duda estos resultados al no ser posible revertir dichas manifestaciones espontáneas de abstinencia con una nueva administración de THC (Abood y Martin, 1992). A pesar de la ausencia de signos somáticos de abstinencia espontánea, se ha podido observar que la interrupción de un tratamiento crónico con THC en monos produce una alteración de una conducta operante previamente adquirida. Dicha alteración ha sido interpretada como una manifestación de una abstinencia espontánea al THC (Beardsley y cols., 1986). El cese de un tratamiento crónico con otros agonistas cannabinoideos tampoco dio lugar a

manifestaciones somáticas de abstinencia (Young *y cols.*, 1981). Sin embargo, un estudio reciente ha descrito la aparición de un síndrome de abstinencia espontáneo tras la interrupción de un tratamiento crónico con el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (Aceto *y cols.*, 2001). La corta vida media del WIN 55,212-2 en comparación con el THC podría explicar estos diferentes resultados. En este sentido, una rápida disminución de los niveles plasmáticos de WIN 55,212-2 podría aparecer tras el cese del tratamiento, la cual no ocurriría al cesar la administración de THC.

La aparición de un síndrome de abstinencia cannabinoide desencadenado por la administración aguda de un antagonista cannabinoide ha sido descrita en múltiples estudios. En efecto, la administración del antagonista selectivo de los receptores CB-1, SR-141716A, en animales (ratón, rata y perro) que han recibido un tratamiento crónico con THC precipita diversos signos que manifiestan una abstinencia cannabinoide. Las dosis de THC requeridas para inducir dependencia física en roedores son muy elevadas. Así, la abstinencia desencadenada por SR-141716A ha sido descrita en roedores que han recibido un tratamiento crónico con una dosis diaria de THC comprendida entre 10 y 100 mg/kg (Aceto *y cols.*, 1996; 2001; Hutcheson *y cols.*, 1998; Cook *y cols.*, 1998; Ledent *y cols.*, 1999; Tzavara *y cols.*, 2000). Las manifestaciones somáticas más características de la abstinencia cannabinoide en roedores son movimientos de sacudida de tronco (wet dog shake) y cabeza, temblor de patas, ataxia, posturas anormales, temblor generalizado, ptosis, piloerección, disminución de la actividad locomotora, masticación, lameteo, fricción y rascado (Aceto *y cols.*, 1996; 2001; Hutcheson *y cols.*, 1998; Cook *y cols.*, 1998; Ledent *y cols.*, 1999; Tzavara *y cols.*, 2000). Durante la abstinencia cannabinoide en roedores es de destacar la presencia de una importante alteración en el control de la motricidad, sin aparición de signos vegetativos (Hutcheson *y cols.*, 1998; Tzavara *y cols.*, 2000). En perros, se han descrito tanto signos somáticos como vegetativos durante el síndrome de abstinencia cannabinoide desencadenado por SR-141716A. Así, la abstinencia cannabinoide en esta especie animal incluye signos tales como diarrea, vómitos, salivación, disminución del comportamiento social, temblores e incremento del periodo de vigila (Lichtman *y cols.*, 1998). Los receptores cannabinoides CB-1 son responsables de las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide. En este sentido, la administración de SR-141716A en ratones knockout deficientes en receptores cannabinoides CB-1 que recibieron un tratamiento crónico con THC no desencadenó ningún signo de abstinencia (Ledent *y cols.*, 1999). La posible capacidad del cannabinoide endógeno anandamida para inducir dependencia física no ha sido aún completamente clarificada y diversos resultados contradictorios han sido publicados sobre este tema (Costa *y cols.*, 2000; Aceto *y cols.*, 2001).

12.3.2. Mecanismos implicados en la dependencia física de cannabinoides

12.3.2.1. Implicación del sistema opioide endógeno

Diversos estudios han descrito la existencia de interacciones bidireccionales entre los sistemas opioide y cannabinoide en el desarrollo de los fenómenos de dependencia física. Así, el antagonista cannabinoide SR-141716A desencadenó en ratas morfino-dependientes diversas manifestaciones conductuales y bioquímicas de abstinencia opioide (Navarro *y cols.*, 1998). Por otra parte, el antagonista opioide naloxona precipitó

diversas manifestaciones de abstinencia en animales cannabinoide-dependientes (Kaymakcalan *y cols.*, 1977; Navarro *y cols.*, 1998). En contraste con estos resultados obtenidos en ratas, un estudio reciente indica que la administración de SR-141716A no precipitó ninguna manifestación de abstinencia en ratones morfino-dependientes, ni la naloxona indujo ninguna modificación comportamental en ratones tratados crónicamente con THC (Lichtman *y cols.*, 2001). Otro estudio también ha descrito que la administración de SR-141716A en ratones morfino-dependientes no indujo la aparición de una conducta saltatoria típica de la abstinencia opioide (Romero *y cols.*, 1998b). El uso de diferentes especies animales (rata y ratón) podría explicar estos resultados aparentemente contradictorios.

Una importante disminución de la severidad de la abstinencia morfinica ha sido observada en ratones knockout deficientes en receptores cannabinoide CB-1 que sugiere la participación de dichos receptores cannabinoide en la dependencia opioide (Ledent *y cols.*, 1999). Asimismo, la administración aguda de diversos agonistas cannabinoide (Bhargava, 1976; Bhargava *y Way*, 1976; Lichtman *y cols.*, 2001), incluido el agonista endógeno anandamida (Vela *y cols.*, 1995) disminuye la severidad de la abstinencia morfinica. Un efecto similar ha sido observado cuando los animales recibieron THC antes de inducir la dependencia morfinica. Así, un tratamiento crónico con THC durante tres semanas antes de comenzar la administración de morfina, disminuyó las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia opioide desencadenado por naloxona y no modificó los efectos reforzantes de la morfina (Valverde *y cols.*, 2001). En consecuencia, la preexposición crónica a cannabinoide no modifica las respuestas motivacionales ni la dependencia inducidas por opiáceos en el animal de experimentación.

La participación del sistema opioide endógeno en la expresión de la abstinencia cannabinoide ha sido estudiada recientemente mediante la utilización de ratones knockout. Así, el síndrome de abstinencia cannabinoide desencadenado por SR-141716A resultó disminuido en animales knockout deficientes del precursor de las encefalinas endógenas (pro-encefalina) (Valverde *y cols.*, 2000), pero no resultó modificado en animales knockout deficientes del precursor de las dinorfinas endógenas (pro-dinorfina) (Zimmer *y cols.*, 2001). La abstinencia cannabinoide tampoco resultó modificada en ratones knockout deficientes en receptores opioides delta o kappa (Ghozland *y cols.*, 2002). En ratones deficientes en receptores opioides mu tan solo se observó una disminución de la abstinencia cannabinoide cuando el THC fue administrado a dosis de 30 ó 100 mg/kg (Lichtman *y cols.*, 2001), pero no se observó modificación alguna cuando el THC fue administrado a dosis de 10 ó 20 mg/kg (Lichtman *y cols.*, 2001; Ghozland *y cols.*, 2002). En ratones doble-mutantes deficientes de receptores opioides mu y delta se observó una disminución de la abstinencia cannabinoide cuando el THC se administró a la dosis de 20 mg/kg (Castañe *y cols.*, 2002).

12.3.2.2. Participación del factor de liberación de corticotropina (CRF) y del sistema dopaminérgico

La elevación de los niveles extracelulares de CRF (Koob, 1996) y la disminución de la actividad dopaminérgica (Rossetti *y cols.*, 1992) a nivel del sistema mesolímbico constituyen modificaciones bioquímicas comunes durante la abstinencia a diversas drogas de abuso como los opioides, los psicoestimulantes y el

etanol. Alteraciones bioquímicas similares han sido también observadas durante la abstinencia cannabinoide. Así, un incremento en la liberación de CRF ha sido descrito en el sistema límbico durante la abstinencia cannabinoide, el cual podría estar relacionado con la aparición de síntomas de estrés y de disforia (Rodríguez de Fonseca *y cols.*, 1997). En acuerdo con esta hipótesis, la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas resultó disminuida durante la abstinencia cannabinoide sugiriendo también la presencia de un estado de disforia (Diana *y cols.*, 1998).

El sistema dopaminérgico no parece desempeñar un papel importante en las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide. En efecto, la administración de antagonistas dopaminérgicos no modificó la severidad de la abstinencia cannabinoide mientras que los agonistas dopaminérgicos elevaron ligeramente dicha severidad (Sañudo-Peña *y cols.*, 1999).

12.3.2.3. Participación de cambios adaptativos a nivel de los sistemas de señalización intracelular

El síndrome de abstinencia cannabinoide se encuentra asociado a un incremento compensatorio en la actividad de un sistema de señalización acoplado al propio receptor cannabinoide, la cascada del adenilato ciclasa. Inicialmente, la activación aguda del receptor cannabinoide produce una inhibición de la actividad adenilato ciclasa. En contraste, durante el síndrome de abstinencia cannabinoide aparece localmente a nivel del cerebelo un incremento en la actividad de dicho enzima. Sin embargo, la actividad adenilato ciclasa no resultó modificada durante la abstinencia en otras estructuras cerebrales tales como el córtex frontal, el hipocampo, el estriado y la sustancia gris periacueductal (Hutcheson *y cols.*, 1998). Un incremento similar en los niveles de AMP cíclico y en la actividad de la proteína kinasa A, ambos pertenecientes al mismo sistema de señalización intracelular, fue observado durante el tratamiento crónico con THC a nivel del cerebelo, estriado y corteza (Rubino *y cols.*, 2000c).

El incremento observado en la vía del adenilato ciclasa a nivel del cerebelo durante la abstinencia cannabinoide parece jugar un papel importante en las manifestaciones somáticas de dicha abstinencia. Así, la actividad adenilato ciclasa aumentó en el cerebelo durante la abstinencia de una manera transitoria y siguiendo el mismo ritmo de intensidad que las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide (Tzavara *y cols.*, 2000). Además, dichas manifestaciones somáticas resultaron atenuadas tras la microinyección local a nivel del cerebelo de un inhibidor selectivo de la vía del adenilato ciclasa (Tzavara *y cols.*, 2000).

12.3.3. Dependencia física de cannabinoides en humanos

Diversos estudios clínicos indican que los grandes consumidores de cannabis no padecen un síndrome de abstinencia con sintomatología severa (Abood *y Martin*, 1992; Haney *y cols.*, 1999a; 1999b). Esta observación clínica está en concordancia con los resultados obtenidos en el animal de experimentación, en el cual no se observan manifestaciones somáticas de abstinencia incluso tras la administración de dosis masivas de THC. Algunos autores han descrito la aparición de un

síndrome de abstinencia moderado en consumidores habituales de preparaciones de cannabis con elevadas concentraciones de principios activos (Hollister, 1986; Haney *y cols.*, 1997; 1999; Kouri *y cols.*, 1999; 2000). El signo más prominente y frecuente en esta abstinencia fue la irritabilidad. Otros signos prominentes fueron anorexia, ansiedad y aumento de la vigilia (Haney *y cols.*, 1999; Kouri *y cols.*, 1999; 2000). Sin embargo, el síndrome de abstinencia no fue lo suficientemente severo como para alterar significativamente la vida cotidiana del individuo (Kouri *y cols.*, 2000). El desarrollo de dependencia de cannabinoides inducida por la administración crónica de THC también ha sido estudiado en voluntarios sanos (Jones *y cols.*, 1981). Tras el cese de un tratamiento crónico de 21 días con THC, un síndrome de abstinencia suave fue observado durante un periodo de aproximadamente 7 días, con una máxima intensidad entre 2 y 4 días tras el cese del tratamiento (Jones *y cols.*, 1981). Los síntomas descritos en voluntarios sanos fueron similares a los observados en grandes consumidores de cannabis. La severidad de la abstinencia dependió de la dosis de THC, la frecuencia de consumo y la duración del uso (Jones *y cols.*, 1981; Hollister, 1986; Haney *y cols.*, 1997; 1999). Este leve síndrome de abstinencia en humanos está en concordancia con los resultados obtenidos en monos que demuestran una supresión de un comportamiento operante previamente aprendido tras el cese de la administración crónica de cannabinoides (Beardsley *y cols.*, 1986).

Manifestaciones severas de una abstinencia han sido descritas tras la administración de antagonistas cannabinoides en animales que previamente han recibido un tratamiento crónico con agonistas cannabinoides. Sin embargo, estos resultados no pueden ser extrapolados a humanos debido a que (1) el uso de dichos antagonistas representa una situación diferente a la del consumo en humanos; (2) las dosis de THC requeridas para inducir dependencia, principalmente en roedores, son extremadamente elevadas y pueden representar una dosis equivalente a un consumo diario de 200-3,000 cigarrillos de marihuana (Tanda *y cols.*, 2000). Considerando la relación directa que existe entre la dosis de THC y la severidad de la abstinencia, estas manifestaciones de abstinencia en animales no son relevantes de la situación producida en humanos por el consumo de cannabis. Sin embargo, estos estudios animales han permitido caracterizar los diferentes cambios adaptativos que se producen durante la exposición crónica a cannabinoides y que son responsables de las manifestaciones del síndrome de abstinencia. Es de destacar que los cambios neurobiológicos descritos en estos estudios son similares a aquellos observados durante la dependencia y la abstinencia a otras drogas de abuso (Koob, 1996).

Bibliografía

- Aboud ME y Martin BR (1992) Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**:201-207.
- Aboud ME, Sauss C, Fan F, Tilton CL y Martin BR (1993) Development of behavioral tolerance to delta 9-THC without alteration of cannabinoid receptor binding or mRNA levels in whole brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**:575-579.
- Aceto MD, Scates SM, Lowe JA y Martin BP (1996) Dependence on Δ 9-tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**:1290-1295.

- Aceto MD, Scates SM, Lowe JA y Martin BP (2001) Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55,212-2. *Eur. J. Pharmacol.* **416**:75-81.
- Bass CE y Martin BR (2000) Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta-9-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug Alcohol Depend.* **60**:113-119.
- Beardsley PM, Balster RL y Harris LS (1986) Dependence on tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**:311-319.
- Beardsley PM y Martin BR (2000) Effects of the cannabinoid CB(1) receptor antagonist, SR141716A, after Delta-9-tetrahydrocannabinol withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* **387**:47-53.
- Bhargava HN (1976) Effect of some cannabinoids on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology.* **49**:267-270.
- Bhargava HN y Way EL (1976) Morphine tolerance and physical dependence: influence of cholinergic agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **36**:79-88.
- Bloom AS, Dewey WL (1978) A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Psychopharmacology.* **57**:243-248.
- Castañe A, Robledo P, Kieffer BL y Maldonado R (2002) Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu- and delta-opioid receptor knockout mice. Neurochemistry Winter Conference, Sölden.
- Compton DR, Dewey WL y Martin BR (1990) Cannabis dependence and tolerance productions. *Adv. Alcohol. Subt. Abuse.* **9**:156-158.
- Cook SA, Lowe JA y Martin BR (1998) CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to delta9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**:1150-1156.
- Costa B, Giagnoni G y Colleoni M (2000) Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide. *Psychopharmacology.* **149**:121-128.
- Deneau GA y Kaymakcalan S (1971) Physiological and psychological dependence to synthetic delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in rhesus monkeys. *Pharmacologist.* **13**:246.
- Diana M, Melis M, Muntoni AL y Gessa, GL (1998) Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:10269-10273.
- Fan F, Tao Q, Abood M y Martin BR (1996) Cannabinoid receptor down-regulation with alteration of the inhibitory effect of CP-55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP-55,940-tolerant mice. *Brain Res.* **706**:13-20.
- Ghozland S, Mathews HWD, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL y Maldonado R (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu- and kappa-opioid receptors. *J. Neurosci.* **22**:1146-1154.
- Gibbins RJ, McDougall J, Miles CG y Marshman JA (1976) Tolerance to marijuana-induced tachycardia in man. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **39**:65-76.
- Haney M., Ward AS, Comer SD, Foltin RW y Fischman MW (1999a) Abstinence symptoms following oral THC administration to humans. *Psychopharmacology.* **141**:385-394.
- Haney M, Ward A S, Comer SD, Wards AS, Foltin RW y Fischman MW (1997) Factors influencing marijuana self-administration by humans. *Behav. Pharmacol.* **8**:101-112.
- Haney M, Ward AS, Comer SD, Wards AS, Foltin RW y Fischman MW (1999) Abstinence symptoms following smoked marijuana in humans. *Psychopharmacology.* **141**:395-404.
- Harris RT, Waters W y Mcendon D (1974) Evaluation of reinforcing capability of delta-9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *Psychopharmacologia.* **37**:23-29.

- Hine B (1985) Morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol: two-way cross tolerance for antinociceptive and heart-rate responses in the rat. *Psychopharmacology*. **87**:34-38.
- Hollister LE (1986) Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* **38**:1-17.
- Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP y Maldonado R (1998) Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.* **125**:1567-1577.
- Jaffe JH (1990) Drug addiction and drug abuse. In: Goodman and Gilman's. *The Pharmacological basis of Therapeutics*. Gilman AG, Rall T, Nies AS Pergamon Press, New York, pp 549-553.
- Jones DL (1978) A case of cannabis ingestion. *New Zel Vet J.* **26**:135-136.
- Jones RT, Benowitz NL y Herning RI (1981) Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence. *J. Clin. Pharmacol.* **21**:143S-152S.
- Kaymakcalan S (1973) Tolerance to and dependence on cannabis. *Bull. Narc.* **25**:39-47.
- Kaymakcalan S y Deneau GA (1972) Some pharmacologic properties of synthetic delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Acta Med. Turcica suppl.* **1**:5-27.
- Kaymakcalan S, Ayhan IH y Tulunay FC (1977) Naloxone-induced or postwithdrawal abstinence signs in Δ^9 -tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Psychopharmacology*. **55**:243-249.
- Koob GF (1996) Drug addiction: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron*. **16**:893-896.
- Kouri EM, Pope HG JR y Lukas SE (1999) Changes in aggressive behavior during withdrawal from long-term marijuana use. *Psychopharmacology*. **143**:302-308.
- Kouri EM y Pope HG JR (2000) Abstinence symptoms during withdrawal from chronic marijuana use. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* **8**:483-492.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W y Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*. **283**:15-19.
- Lichtman AH, Wiley JL, Lavecchia KL, Neviasser ST, Arthur DB, Wilson D. M y Martin BR (1998) Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* **357**:139-148.
- Lichtman AH, Sheikh HH, Loh SM y 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.
- Maldonado R y Rodriguez de Fonseca F (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J. Neurosci.* En prensa.
- Mao J, Price DD, Lu J, Keniston L y Mayer DJ (2000) Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neurosci. Lett.* **280**:13-16.
- Martin BR, Welch SP y Abood M (1994) Progress toward understanding the cannabinoid receptor and its second messenger systems. *Adv. Pharmacol.* **25**:341-397.
- Martin BR, Dewey WL, Harris LS y Belckner JS (1976) 3 H-delta-9-tetrahydrocannabinol tissue and subcellular distribution in the central nervous system and tissue distribution in peripheral organs of tolerant and nontolerant dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **196**:128-144.
- Martin M, Ledent M, Parmentier M, Maldonado R y Valverde O (2000) Cocaine but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB-1 knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* **12**:4038-4046.

- Martin WJ, Coffin PO, Attias E, Balinsky M, Tsou K y Walker JM (1999) Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Res.* **822**:237-242.
- Martin WJ, Hohmann AG y Walker JM (1996) Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *J. Neurosci.* **16**:6601-6611.
- McMillan DE, Harris LS, Frankenheim JM y Kennedy JS (1970) L- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in pigeons: tolerance to the behavioral effects. *Science.* **169**:501-503.
- Melvin LS, Milne GM, Jhonson MR, Subramaniam B, Wilken GH y Howlett AC (1993) Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol. Pharmacol.* **44**:1008-1015.
- Navarro M, Chowen J, Carrera MRA, Del Arco I, Villanua MA, Martin Y, Roberts AJ, Koob GF y Rodriguez de Fonseca F (1998) CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport.* **9**:3397-3402.
- Pertwee R, Stevenson LA y Griffin G (1993) Cross-tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN 55,212-2 and anandamide. *Br. J. Pharmacol.* **110**:1483-1490.
- Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF y Weiss F (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science.* **276**:2050-2054.
- Rodriguez de Fonseca F, Gorriti MA, Fernandez-Ruiz JJ, Palomo T y Ramos JA (1994) Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **47**:33-40.
- Romero J, Berrendero F, Manzanares J, Pérez A, Corchero J, Fuentes A, Fernández-Ruiz JJ y Ramos JA (1998a) Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Synapse.* **30**:298-308.
- Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Vela G, Ruiz-Gayo M, Fuentes JA y Ramos JA (1998b) Autoradiographic analysis of cannabinoid receptor binding and cannabinoid-agonist-stimulated [35 S]GTP γ S binding in morphine-dependent mice. *Drug. Alcohol. Dep.* **50**:241-249.
- Romero J, Garcia L, Fernandez-Ruiz JJ, Cebeira M y Ramos JA (1995) Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide or to delta-9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **51**:731-737.
- Rossetti ZL, Hmaidan Y y Gessa GL (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J. Pharmacol.* **221**:227-234.
- Rowen DW, Embrey JP, Moore CH y Welch SP (1998) Antisense oligodeoxynucleotides to the kappa $_1$ receptor enhance delta-9-THC-induced antinociceptive tolerance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**:399-404.
- Rubino T, Massi P, Patrini G, Venier I, Giagnoni G y Parolaro D (1994) Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptors mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroreport.* **5**:2493-2496.
- Rubino T, Patrini G, Massi P, Fuzio D, Vigano D, Giognoni G y Parolaro D (1998) Cannabinoid-precipitated withdrawal: a time-course study of the behavioral aspect and its correlation with cannabinoid receptors and G protein expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**:813-819.

- Rubino T, Patrini G, Parenti G, Massi P y Parolaro D (1997) Chronic treatment with a synthetic cannabinoid CP55,940 alters G protein expression in the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* **44**:191-197.
- Rubino T, Vigano D, Costa B, Colleoni M y Parolaro D (2000a) Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-0-(3-{(35)S} Thiotriphosphate) binding without receptor down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats. *J. Neurochem.* **75**:2478-2484.
- Rubino T, Vigano D, Massi P, Spinello M, Zagato E, Giagnoni G y Parolaro D (2000b) Chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions. *Neuropharmacology.* **39**:1331-1336.
- Sañudo-Peña MC, Force M, Tsou K, McLemore G, Roberts L y Walker JM (1999) Dopaminergic system does not play a major role in the precipitated cannabinoid withdrawal syndrome. *Acta Pharmacol. Sin.* **20**:1121-1124.
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA y Childers SR (1996) Effects of chronic treatment with delta-9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTPγS autoradiography in rat brain. *J. Neurosci.* **16**:8057-8066.
- Tanda G, Munzar P y Goldberg SR (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat. Neurosci.* **3**:1073-1074.
- Tzavara ET, Valjent E, Firmo C, Mas M, Beslot F, Defer N, Roques BP, Hanoune J y Maldonado R (2000) Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **12**:1038-1046.
- Valverde O, Maldonado R, Valjent E, Zimmer AM y Zimmer A (2000) Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J. Neurosci.* **15**:9284-9289.
- Valverde O, Noble F, Beslot F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC y Roques BP (2001) Delta 9-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.
- Vela G, Ruiz-Gayo M y Fuentes JA (1995) Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine. *Neuropharmacology.* **34**:665-668.
- Welch SP (1997) Characterization of anandamide-induced tolerance: comparison to delta-9-tetrahydrocannabinol induced interactions with dynorphinergic systems. *Drug Alcohol. Depend.* **45**:39-45.
- Westlake TM, Howlett AC, Ali SF, Paule MC, Scallet AC y Slikker W (1991) Chronic exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol fails to irreversibly alter brain cannabinoid receptors. *Brain Res.* **544**:145-149.
- Young AM, Katz JL y Woods JH (1981) Behavioral effects of levonantradol and nantradol in the rhesus monkey. *J. Clin. Pharmacol.* **21**:348S-360S.
- Zhuang S, Kittler J, Grigorenko EV, Kirby MT, Sim LJ, Hampson RE, Childers SR y Deadwyler SA (1998) Effects of long-term exposure to delta 9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Mol. Brain Res.* **62**:141-149.
- Zimmer A, Valjent E, Koning M, Zimmer AM, Clarke S, Robledo P, Chen CC, Hahn H, Valverde O, Hill RG, Kitchen I y Maldonado R (2001) Absence of delta-9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J. Neurosci.* **21**:9499-9505.

Epidemiología del consumo de cánnabis en jóvenes y adolescentes

13

M. D. Baño

13.1. Introducción

El consumo de drogas representa en el momento actual uno de los problemas con más relevancia a los que se enfrentan muchos países del mundo no sólo por la enorme magnitud del problema sino también por la gravedad y complejidad de las consecuencias personales y sociales derivadas del mismo (Alguacil, 2000). Esta complejidad viene determinada por una serie de factores entre los cuales podemos destacar los siguientes: las múltiples causas y dimensiones del fenómeno de acuerdo con los cuales no existe una única razón explicativa del consumo de drogas, ni sus posibles consecuencias se manifiestan en un solo plano; el carácter dinámico de las drogodependencias; los discursos sociales en relación al uso y abuso de drogas. En algunas culturas como la nuestra la tolerancia frente al alcohol, lleva a infravalorar los graves efectos de su consumo abusivo sobre los consumidores y sobre su entorno familiar y social.

En este contexto, la implicación indiscriminada en el uso de sustancias por parte de los más jóvenes de nuestra sociedad no ha tardado en mostrar su gravedad y su alarmante incremento. Esta situación, toma especial relevancia cuando se tiene en consideración que la adolescencia se caracteriza por ser un período evolutivo de la infancia a la madurez donde se producen una gran cantidad de cambios corporales, afectivos, cognitivos y de valores que junto con un mayor deseo por obtener experiencias novedosas e intensas, por ampliar las redes sociales, la búsqueda de autonomía y de una identidad más definitorias, con sus propios límites, representa un período vital de especial riesgo para el uso/abuso de drogas. Es en esta etapa en la que se realizan los primeros acercamientos a las sustancias adictivas, que se mantienen durante años dando lugar a determinados patrones de consumo que se consolidan en la vida adulta (Graña y cols., 2000).

13.2. Uso, abuso y dependencia en adolescentes

Si nos referimos en general al *consumo de drogas* en la población adolescente, se define como un consumo recurrente y compulsivo de cualquier sustancia química

que conlleve consecuencias negativas en cualquier área de la vida o del desarrollo del joven como la salud, la familia, las relaciones sociales, el rendimiento escolar y/o laboral, los problemas económicos, legales y el desarrollo personal (Flynn, 1994).

Se habla de *uso abusivo*, cuando las consecuencias anteriormente señaladas se hacen más evidentes o dificultan el desempeño de actividades cotidianas. Cuando estas conductas de alto riesgo se mantienen en el tiempo las consecuencias derivadas adquieren mayor gravedad necesitando de una intervención clínica.

Por último el concepto de *dependencia de sustancias*, aplicado a los adolescentes podría ser abuso de sustancias tóxicas ya que se refiere a aquellos jóvenes que tienen problemas o dificultades serias provocadas por el consumo de sustancias (Graña y cols., 2000).

El consumo de drogas en la adolescencia suele progresar a través de diferentes etapas o fases: experimentación, consumo abusivo temprano, abuso y adicción. (Kandel y Logan, 1984).

13.3. Patrón de consumo de cannabis en España

El cannabis es la droga ilegal más consumida en los jóvenes de nuestro país. Uno de cada cinco estudiantes de entre 14 a 18 años consume cannabis según los datos de la última encuesta Escolar del Plan Nacional sobre Drogas (PNSD, 2000). La cifra supone un aumento del 9% en relación con la cifra registrada en 1998.

Las edades de inicio al consumo de tabaco, alcohol y cannabis se han estabilizado en el año 2000, tras años de continuados descensos. Sin embargo la edad de inicio para el resto de las sustancias se ha elevado. El tabaco es la sustancia que se empieza a consumir a una edad más temprana seguida por el alcohol (a los 13,6 años), cannabis (14,8) y cocaína a los (15,7 años).

Otra circunstancia que refleja el informe es la confirmación del *policonsumo de sustancias*. Se observa una asociación entre los consumos de alcohol, tabaco y cannabis. Aquellos escolares que han experimentado con el tabaco son en un 95% de los casos también consumidores ocasionales de alcohol y en un 58% de cannabis.

Los datos de la *“Encuesta sobre drogas a la población escolar del 2000”* realizada por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid refleja que el alcohol sigue siendo la sustancia más consumida entre los jóvenes de 14 a 18 años (un 77.4% declara haber consumido en los últimos 30 días), seguida de tabaco (29.7%) y después cannabis (20.7%) y éxtasis (CAM, 2000)

Cuando se estudian las diferencias de consumo con las encontradas en el total de España, cabe destacar que mientras las prevalencias de tranquilizantes y cocaína son menores en Madrid, el consumo de cannabis y éxtasis es mayor. Estos datos se basan en que las jóvenes madrileñas presentan una prevalencia de consumo mayor que las del resto de España en alcohol, tabaco, cannabis y éxtasis ya que tienen menos rechazo a consumirlos, mientras que sí existe rechazo a cocaína, heroína y tranquilizantes. Además en Madrid, existe una mayor disponibilidad percibida de éxtasis frente a cocaína.

Un estudio realizado en Majadahonda (municipio situado en la zona Noroeste de la Comunidad de Madrid) confirma que alcohol y tabaco son las que obtienen

mayores prevalencias de consumo tanto si se analiza el contacto esporádico con cualquiera de las sustancias como el consumo más habitual realizado en el último mes, seguida de los cannabis, el 28% afirman haberla consumido en el mes previo a la encuesta (Graña y cols., 2000), que es una cifra ligeramente superior a otros estudios actuales (PNSD, 2000; CAM, 2000; Torres y Dominguez, 1997; Elzo, 1996).

Nos encontramos ante una situación en la que el monoconsumo es prácticamente inexistente y lo que prevalece es una pauta general mucho más cercana al *uso de varias sustancias de forma conjunta*, donde aparecen en primer lugar asociado el consumo de *alcohol, tabaco y cannabis*, poniendo de manifiesto la relación existente entre el consumo de drogas convencionales y el uso habitual de cannabis (Campins y cols., 1996).

Respecto al *papel que los cannabinoides* pueden jugar en la escalada de consumo de drogas de mayor poder adictógeno, algunas evidencias tanto en humanos como en animales de experimentación apuntan que podría jugar este papel aunque otros lo descartan (ver revisión en Fernández-Ruiz y cols., 2001), ya que no hay evidencias que sustenten esta teoría, y la gran mayoría de los que consumen cannabis no acaban consumiendo heroína, anfetaminas u otras drogas ilegales, aunque sí es cierto que la gran mayoría de los heroinómanos han consumido cannabis (y alcohol y tabaco).

Lo que si se ha podido comprobar a través de diferentes estudios publicados desde el comienzo de los 90 (Comas, 1990; Luengo y cols., 1992) y antes como modelos explicativos del consumo de drogas (Kandel, 1978) es que se puede interpretar el uso de alcohol, tabaco y cannabis como una condición previa que tiene importancia en el consumo de cannabis, de la misma manera que también se ha podido observar que existe una relación entre el consumo del resto de drogas ilegales entre ellas (anfetaminas, drogas de diseño, cocaína, heroína, etc) (Graña y cols., 2000).

Este modelo de *consumo múltiple* de sustancias en la adolescencia, incrementa la gravedad del fenómeno tanto en el ámbito preventivo como en el asistencial, ya que los efectos y consecuencias derivadas del poliuso provocan interacciones metabólicas cuyos efectos y consecuencias clínicas no siempre son predecibles y pueden provocar en muchos casos una mayor toxicidad, dificultando el diagnóstico y el abordaje de sus consecuencias.

13.4. Riesgos percibidos del consumo de cannabis en escolares

Los datos obtenidos sobre drogas en la población escolar del 2000 de la Agencia Antidroga de la CAM muestran en datos estadísticos la opinión de los escolares en relación al consumo de drogas y los riesgos que perciben en relación a su consumo. La medición de datos se hace evaluando la proporción de escolares que piensan que esa conducta puede causar problemas.

En relación al riesgo referido al consumo de cannabis, el 35.7% piensan que consumir alguna vez puede ocasionar problemas y el 77.3% piensan que estos problemas pueden aparecer si se consume habitualmente y las razones que indican en relación a los cannabis son los efectos en la salud (75.3%), el 69.2% piensa que pueden producir adicción, en el 41.6% que puede ocasionar problemas familiares y el 68% creen que puede llegar a destruir al individuo. Además, de la muestra el

65% dicen que no han consumido nunca cannabis y esperan no hacerlo en la vida, aunque el 53.2% creen que es muy fácil de conseguir (CAM, 2000).

13.5. Efectos del consumo de cannabis

Los efectos del consumo de cualquier droga, incluyendo los cannabis, varían de persona a persona y dependen de múltiples factores que incluyen factores individuales, en relación con el peso, estado de salud, tipo de preparación (riqueza en principio activo), forma de administración, habilidad para inhalar, dosis utilizada, si se está acostumbrado a tomarla, para qué se toma, qué efectos se buscan, factores metabólicos, si se combina con otras drogas y también en gran medida los efectos dependen de la personalidad del consumidor, de la compañía y el ambiente, siendo relajante si el sujeto inhala sólo y euforizante si se fuma en grupo.

13.6. Uso ocasional de pequeñas cantidades

No existen evidencias de que el uso de pequeñas cantidades de cannabis pueda provocar daños permanentes en la salud. Los efectos pueden durar 2 a 3 horas e incluyen:

Efecto psicológicos: se inician a los pocos minutos y duran 1-1.5 horas. Comienzan con un período excitatorio, sensación de euforia y bienestar, hilaridad locuacidad y megalomanía sobre todo si el consumo se realiza en grupo. En una segunda etapa, es un estado de relajación y reflexión. También puede ayudar a dormir. Las funciones motoras complejas se ven alteradas lo que implica riesgos en la conducción de vehículos, alteración en la percepción de distancias y aumento del tiempo de reacción.

Reacciones psiquiátricas en forma de crisis de ansiedad o ataques de pánico de breve duración o de accesos depresivos.

Incremento del apetito: con frecuencia aparece sequedad de boca, sed y aumento del apetito (ansia de comer dulce)

Alteraciones perceptivas: el uso de cannabis aumenta la conciencia perceptiva de los colores sonidos y otras sensaciones. Puede afectar la percepción del tiempo y el espacio.

Pensamiento y memoria: puede afectar el curso del pensamiento, la memoria y la habilidad del pensamiento.

Sistema cardiovascular: aumento del gasto cardíaco, con taquicardias sinusales.

Ojo: dilatación de vasos conjuntivales con enrojecimiento ocular

Aparato respiratorio: broncodilatación, efecto que se ve enmascarado por el efecto irritante del humo (Leza, 1998)

13.7. Efectos a largo plazo. Peligros para la salud

Los peligros para la salud del consumo de marihuana o hachís están relacionados con el consumo crónico, ya que interfiere con el aprendizaje, la capacidad de concentración escolar y la memoria .

Efectos en los pulmones: el consumo de hachís o marihuana frecuentemente incrementa el riesgo de problemas respiratorios como bronquitis crónica, laringitis o cáncer de pulmón.

Síndrome amotivacional: el uso regular, sobretodo en gente joven, hace que tengan menos energía y motivación para estudiar o trabajar desapareciendo al interrumpir el uso.

Efectos en el cerebro: la concentración, memoria y habilidad para aprender pueden reducirse con el uso regular de cannabinoides. Además se produce interrupción de la continuidad del discurso (lagunas) y lenguaje monótono (Leza, 1998). Estos efectos perduran después de varios meses de cesar el consumo y empeora si el uso continúa con el paso de los años (Solowij y cols., 2002).

Hormonas: los cannabis pueden afectar la producción de hormonas. Alteraciones en el ciclo menstrual (ciclos anovulatorios) y disminución en la producción de espermatozoides (oligospermia). Estudios en animales de experimentación han valorado que altas dosis de THC afecta la función inmune. Los cannabis no aceleran la progresión del VIH/SIDA, sin embargo la administración crónica de THC no favorece la inmunidad.

Efectos en el embarazo: El uso de cannabis durante el embarazo puede provocar problemas de bajo peso en los recién nacidos así como problemas inmunológicos tendiendo a desarrollar mas problemas de salud. La madre lactante pasa parte del THC al recién nacido a través de la leche materna y esto puede provocar alteraciones en el desarrollo motor.

Trastornos psiquiátricos: En general se habla de tres circunstancias relaciones con el uso de cannabis y la aparición de psicosis.

- Síntomas psicopatológicos en relación directa a la ingesta de THC. Psicosis cannabinoide.
- Desencadenante. El uso de cannabis puede precipitar una psicosis latente. En otras palabras puede precipitar un trastorno psiquiátrico preexistente o bien puede interactuar con la vulnerabilidad subyacente de la persona hacia estos trastornos dando pie para que se produzca un primer episodio patológico.
- Automedicación. El sujeto intenta aliviar una patología psiquiátrica con el consumo de cannabis. Esta conducta conduce a una rápida dependencia y empeoramiento de la clínica psiquiátrica. (Martín del Moral, 1998)

Otros órganos: el consumo de cannabis incrementa las necesidades de oxígeno del miocardio y puede desencadenar crisis de ángor en paciente con coronariopatía. Mayor incidencia al acné. Problemas bucodentales (Leza, 1998).

13.8. Potencial adictivo

El uso regular de cannabis puede provocar una tolerancia moderada.

Tolerancia quiere decir que los efectos disminuyen con el tiempo y que necesita más cantidad para obtener el mismo efecto. La tolerancia puede aparecer con dosis repetidas durante varias semanas con efectos diferentes. La dependencia puede ser psicológica, física o ambas.

Dependencia psicológica: quiere decir que el uso de cannabis puede llegar a ser más importante que otras actividades en su vida. El uso de cannabis llega a ser parte de su estilo de vida (para reducir el estrés, aumentar la relajación) y en algunos casos se llega a depender de él teniendo dificultades para parar de consumirlo.

Dependencia Física: el uso frecuente puede llegar a producir dependencia física. La persona se adapta a la droga y el cuerpo se habitúa a funcionar bajo los efectos de la misma. El cannabis posee un potencial de adicción.

13.9. Síndrome de abstinencia

Existen datos que evidencian síntomas de abstinencia en consumidores crónicos al interrumpir el consumo (Duffy y cols., 1996) con una duración que varía de 4 días hasta una semana, donde los síntomas más habituales incluyen: ansiedad, irritabilidad, trastornos del sueño que a veces duran más de una semana, alteraciones del humor, pérdida de apetito, sudoración, escalofríos ocasionales y síntomas menos comunes que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, hipersalivación y temblores. Otros estudios han evidenciado que a diferencia de otras drogas de abuso, sólo una pequeña parte de consumidores habituales de cannabis desarrollan patrones de dependencia significativos (Perkonigg y cols., 1999). El estudio de este hecho en animales de experimentación ha demostrado que la abstinencia a cannabinoides no se produce de forma espontánea al cesar la administración de estos compuestos, posiblemente como consecuencia de las particulares características farmacocinéticas de los cannabinoides (Maldonado, 2001), aunque otros grupos de investigación si que han demostrado manifestaciones de abstinencia en animales de experimentación fundamentalmente motoras sin cambios neurovegetativos (Aceto y cols., 1995; Tsou y cols., 1995; Hutcheson y cols., 1998; Cook y cols., 1998), aunque las dosis de THC usadas en estos estudios para generar tolerancia excede en mucho las que se pueden medir en fumadores de marihuana o hachís. Las conclusiones de la revisión realizada por Fernández-Ruiz y cols. (2001) señalan que en individuos tolerantes a Δ^9 -THC el cese de consumo podría estar asociado a la aparición de ciertos signos de abstinencia, aunque en animales de experimentación eso sólo se produce tras el bloqueo selectivo de receptores CB1 (Fernández Ruiz y cols., 2001)

13.10. Cannabis y ley

El cannabis es una droga ilegal. En nuestro país la Ley orgánica 1/92 del 21 de Febrero sobre protección de la Seguridad Ciudadana en sus artículo 25.1 y 2, determina que constituyen infracciones graves a la seguridad ciudadana el consumo en lugares, vías establecimientos o transportes públicos, así como la tenencia ilícita aunque no estuviera destinada al tráfico de drogas tóxicas, estupefacientes o sustancia psicotrópicas, siempre que no constituya infracción penal, así como el abandono en los sitios mencionados de útiles o instrumentos utilizados para el consumo. Asimismo las sanciones impuestas por estas infracciones podrán suspenderse si el infractor se somete a un tratamiento de deshabitación en un centro o servicio

debidamente acreditado en la forma o por el tiempo que reglamentariamente se determine (Ley Orgánica 1/1992)

Este motivo hace que acudan a los programas de drogas jóvenes, en su gran mayoría, para obviar el pago de dicha multa. Este acercamiento ofrece una posibilidad de manejo para el diagnóstico precoz del consumo de sustancias en esta población.

13.11. Efectos del hachís en jóvenes consumidores del distrito de Majadahonda

En el Programa Municipal de Drogas de Majadahonda se viene realizando desde el año 1996 un programa de educación para la salud dirigido a jóvenes que son multados por tenencia o consumo de hachís con el objetivo de informar a esta población sobre los efectos del consumo de sustancias así como detectar, diagnosticar y tratar situaciones de alto riesgo derivadas de su uso (Mendina *y cols.*, 2000).

Desde Septiembre de 2001, los que acuden al programa rellenan un cuestionario anónimo, con el objetivo de determinar el perfil de esta población, los efectos secundarios y complicaciones producidos por el consumo de hachís, así como la aparición de síntomas de abstinencia tras la interrupción del consumo.

Los primeros resultados obtenidos sobre 100 encuestas realizadas muestran un perfil de jóvenes consumidores varones en su gran mayoría, con una edad media de 20 años, que viven en los municipios de la zona noroeste de la Comunidad de Madrid, estudiantes donde el consumo en más de la mitad de los casos se produce con amigos.

El 50% de ellos consumen diariamente, el 36.6% esporádicamente y el 17.4% los fines de semana. Entre los efectos secundarios más habituales derivados del consumo habitual de hachís destacan las lipotimias, reacciones paranoides, alucinaciones y arritmias cardíacas sin obtener relación entre la frecuencia de consumo y la aparición de estos efectos. En cambio los que tienen problemas depresivos están relacionados con el uso diario de hachís. En aquellos que el consumo es habitual contestan en el 61% que se sienten apáticos, sin ganas de hacer nada, y el 41.6% continúan consumiendo a pesar de haber tenido problemas sociales derivados de su uso, familiares y en los estudios. Entre los resultados más llamativos cuando dejan de consumir es que más de la mitad de los encuestados han sentido deseos de volver a consumir y el 31.4 % han tenido síntomas de irritabilidad entre los que consumen a diario, aumentando el consumo de tabaco en el 49% de los casos sin relación con la cantidad o frecuencia de consumo.

13.12. Conclusiones

El consumo de cannabis aumenta entre los jóvenes progresivamente, con edades de inicio cada vez mas temprana. La evolución del consumo en la adolescencia, desde la experimentación, el consumo abusivo temprano, hasta llegar al abuso y la adicción, va a determinar diferentes consecuencias tanto en la salud como en su estilo

de vida social, escolar, familiar, así como en su futuro. Los resultados preliminares de esta encuesta realizada a jóvenes que consumen hachís muestra algunas consecuencias derivadas de su uso y apunta hacia la aparición de algunos síntomas de abstinencia relacionados con la frecuencia y cantidad de consumo. Será necesario realizar más estudios sobre esta población en distintas zonas de la Comunidad de Madrid y otras Autonomías, para tratar de evaluar las consecuencias derivadas en relación a patrones de uso y abuso, estableciendo programas de intervención específicos que detecten los riesgos derivados del consumo y tratar las consecuencias.

Bibliografía

- Aceto MD, Scates SM, Lowe JA y Martin BR (1995) Cannabinoid precipitate withdrawal by the selective cannabinoid receptor antagonist, SR 141716A.E. *European Journal Pharmacology*. **282**:R1-R2.
- Alguacil LF (2000) Actualidad y perspectivas en el estudio experimental de las drogodependencias. *Facultad de CC. Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo. CEU*. 5-45.
- Campins M, Gasch J, Hereu P, Roselló J y Vaqué J (1996) Consumo y actitudes de los adolescentes frente a sustancias adictivas: encuesta de prevalencia. *Anales de pediatría*. **45**(5):475-478.
- Comas D (1990) El síndrome de haddhock: alcohol y drogas en las enseñanzas medias. *Madrid: CIDE*.
- Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. (2000) Encuesta sobre drogas a la población escolar del 2000. *Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid*.
- Cook SA, Lowe JA y Martin BR (1998) CB1 receptor antagonist precipitate withdrawal in mice exposed to delta9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**:1150-1156.
- Duffy A y Milin R (1996) Case study: withdrawal syndrome in adolescent chronic cannabis users. *J.Am. Acad. Child Adoles Psychiatry*. **35**(12):1618-1621.
- Elzo J (1996) Drogas y escuela. *Bilbao: Departamento de Justicia, Economía, Trabajo y Seguridad Social. Secretaria de Drogodependencias*.
- Fernández-Ruiz J, González S, Cebeira M y Ramos JA (2001). Bases Moleculares y farmacológicas de la tolerancia/ Dependencia de cannabinoides. *Conductas Adictivas* (<http://www.conductasadictivas.org/conductas/html/antiores/articulos/cannabinoides.htm>).
- Flynn S (1994) Consumo de sustancias tóxicas por adolescentes. En M.F.Fleming y K. Lawton Barry (eds). *Guía Clínica de los trastronos adictivos*. *Madrid: Mosby Doyma libros S.A.*
- Graña JL, Muñoz MJ y Delgado S (2000) Investigación sobre el consumo de drogas en adolescentes de Majadahonda: Factores de riesgo y protección. *Excmo. Ayto. de Majadahonda con la colaboración de la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid*.
- Hutcheson DM, Tzavara ET, Smajada C, Vasljent E, Roque BP, Hanour y Maldonado R (1998) Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence mice chronically treated with delta9-tetrahydrocannabinol. *British Journal Pharmacology*. **125**:1567-1577.
- Kandel DB, Kessler RC y Margullies RS (1978) Antecedents of adolescent initiation into stages of drug use: a development analysis. *Journal of Youth and Adolescence*. **7**:13-40.

- Ley Orgánica 1/1992 sobre protección de la seguridad ciudadana. *Capítulo IV. Régimen sancionador. Sección Primera. Infracciones. Artículo. 25.1 y 25.2.*
- Leza JC (1998) Cannabis II. Dependencia En: Lorenzo P, Ladero J.M, Leza J.C, Lizasoain I. (eds). *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación. Madrid. Editorial Médica Panamericana.*
- Luengo A, Carrillo MT, Otero-López JM y Romero E (1992) Análisis psicosocial del consumo de drogas en los adolescentes gallegos. *Junta de Galicia. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales. Comisionado del Plan Autonómicos sobre Drogodependencias.*
- Martín del Moral M (1998) Cannabis II. Efectos psicopatológicos y psiquiátricos. En: Lorenzo P, Ladero J.M, Leza J.C, Lizasoain I. (eds). *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación. Madrid. Editorial Médica Panamericana.*
- Mendina C y De Antonio V (2000) Programa de prevención con jóvenes de alto riesgo. "Cómo quitarse una multa o hacer prevención". *Idea Prevención. 21,25.*
- Perkonig A, Lieb R, Hofler M, Schuster P, Sonntag H y Wittchen HU (1999) Pattern of cannabis use, abuse and dependence over time: incidence, progression stability in a sample of 1228 adolescents. *Addiction. 94:1663-1678.*
- Plan Nacional sobre Drogas (2000) Memoria 2000. *Madrid: Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio del Interior.*
- Solowij N, Stephens RS, Roffman RA, Babor T y cols. (2002) Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *Jama. 287:1123-1131.*
- Torres AJ y Dominguez MD (1997) Consumo de drogas ilegales y variables sociodemográficas en la adolescencia: Estudio epidemiológico comunitario en Galicia. *Revista de Psiquiatría Infanto Juvenil. 1:4-9.*
- Tsou K, Patrick SL y Walker JM (1995) Physical withdrawal in rats tolerant to delta9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *European Journal Pharmacology. 280:R13-R15.*

Efectos psicológicos de los cannabinoides

14

L.A. Núñez Domínguez

14.1. Introducción

Los efectos psicológicos de los cannabinoides son conocidos desde hace mucho tiempo, aunque la primera descripción científica de tales efectos la encontramos a finales del siglo XIX por parte de Moreau (1845), quién describió los efectos tras haber consumido cannabis él mismo.

Mucho se ha escrito desde entonces, con épocas de numerosos trabajos acerca de los efectos mentales del consumo de la marihuana, pasando por otras donde parecía haberse terminado toda discusión o investigación acerca de este asunto. En los últimos años, con el descubrimiento y estudio del sistema endocannabinoico y las posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides estamos asistiendo a una nueva época de intenso trabajo en este campo de investigación, en el cual permanecen aún muchos aspectos por descubrir y discutir.

14.2. Factores que influyen en los efectos psicológicos de los cannabinoides

Los efectos psicológicos y conductuales de la marihuana varían según se fume o se consuma por vía oral o intravenosa. Cuando se fuma se absorbe en pocos segundos y alcanza rápidamente el cerebro, como sustancia muy soluble en lípidos. El pico en sangre aparece cuando el cigarro ha sido consumido (Agurell *y cols.*, 1984; Huestis *y cols.*, 1992a, 1992b). La ingestión oral de THC o marihuana hace que la aparición del pico máximo en sangre se demore hasta 1 ó 3 horas después de una dosis oral (Adams y Martin, 1996; Agurell *y cols.*, 1984). Luego el comienzo de los efectos psicológicos es mucho más rápido cuando se consume como cigarro. La vida media del THC está estimada en unas 20 horas .

Un consumidor de marihuana experto puede llegar a controlar y regular la dosis necesaria para obtener los efectos deseados y obviar los efectos indeseables de la marihuana (Herning *y cols.*, 1986; Kelly y Jones, 1992).

La marihuana comparte diversas vías metabólicas con otras sustancias de uso común, como el alcohol, el tabaco y otras drogas terapéuticas, con lo que las interacciones son inevitables. Por ejemplo, el THC y el cannabidiol inhiben el metabolismo de las sustancias metabolizadas por el sistema de enzimas oxidasa hepático (Benowitz y Jones, 1977 y 1981; Hollister, 1986b).

La absorción y el aclaramiento de otras sustancias tomadas a la vez que la marihuana se ven afectadas (enlentecidas) dependiendo del tiempo y secuencia del uso, e incluso del consumo previo. Por ejemplo, el consumo de etanol justo después del consumo de marihuana provoca un pico en sangre mucho menor que consumida una hora antes de la marihuana, a causa de que el THC enlentece el vaciamiento gástrico, así como la absorción del etanol.

Otro factor que modifica o puede modificar el efecto de la marihuana es el fenómeno de la tolerancia. La tolerancia a diversos efectos (cardiovasculares, autonómicos, etc) se adquiere rápidamente tras repetidos usos de marihuana, tanto fumada como consumida por vía oral. Dicha tolerancia desaparece con rapidez si se elimina el consumo (Jones y cols., 1981)

También se ha descrito el fenómeno de la tolerancia inversa, es decir, que los efectos son mayores con dosis más pequeñas, lo que inevitablemente conduce a la aparición de efectos indeseables, sobre todo en lo referente a los efectos psicológicos y conductuales.

14.3. Motivaciones para el consumo

El consumidor de cannabis busca con su uso unos efectos que se le suponen a esta sustancia, como son la euforia, el aumento de la sociabilidad, la disminución de la ansiedad que provocan ciertas situaciones sociales (timidez, vergüenza), la “espontaneidad” o simplemente la identificación social con un grupo concreto (Bachman y Reese, 1979). Este patrón de conducta (el consumo como medio para lograr determinados fines) es el habitual entre los consumidores de cualquier tóxico; para la cocaína o las drogas sintéticas, el efecto esperado es la activación generalizada de las funciones físicas y psíquicas; para la heroína es la relajación.

Esto en lo referente a la población sana; en cuanto a los esquizofrénicos, cada vez parece más claro que el motivo del consumo quedaría explicado por la llamada “teoría de la automedicación” (Khantzian, 1985). Dicha teoría supone que, ante una enfermedad mental concreta, el paciente elige una sustancia que le libera de los padecimientos que le causa dicha enfermedad.

En el caso del cannabis se busca la disminución de la tensión psíquica, la desaparición de las molestas alucinaciones auditivas, la superación de un estado de apatía y abulia, la mejoría en las relaciones sociales (el sujeto esquizofrénico tiende al aislamiento social) y la superación de los estados depresivos que suelen acompañar a esta enfermedad (Trefert, 1978; Dixon y cols., 1991). Parece que inicialmente lo consiguen, pero la rápida aparición de tolerancia a los efectos arriba mencionados conduce a estos pacientes a tener que aumentar las dosis y la frecuencia del consumo, con lo que lo que se produce es un agravamiento de la enfermedad, con graves consecuencias para el sujeto (Núñez Domínguez, 1997).

14.4. Efectos mentales y conductuales

14.4.1. Efectos agudos comunes

Los efectos mentales y conductuales de la marihuana consisten en un estado de bienestar (a menudo denominado euforia), sentimientos de relajación, alteraciones en la percepción del tiempo y distancia (generalmente en forma de percepciones distorsionadas, el tiempo va más despacio), experiencias sensoriales aumentadas (hiperestesia, como el aumento en el cromatismo de los colores), sonrisa fácil (aspecto bobalicón), locuacidad e incremento de la sociabilidad en un entorno social (Maykut, 1985). Deterioro de la memoria para hechos recientes, en la coordinación motora (por ejemplo, para conducir vehículos) y otras capacidades psicomotoras, dificultades de concentración, estados estuporosos (“estar colgado”), enlentecimiento en las reacciones, disminución de la actividad mental y alteración de la visión periférica son también efectos habituales (Adams y Martin, 1996; Fehr y Kalant, 1983; Hollister, 1988a; Institute of Medicine, 1982).

Tras repetidas exposiciones a la marihuana, aparece rápidamente tolerancia para muchos efectos subjetivos y psicológicos (Fehr y Kalant, 1983; Jones, 1987). Así, la intensidad de los mismos está determinada no sólo por la dosis de THC sino también por experiencias pasadas, las expectativas del consumidor, el ambiente y las diferentes sensibilidades (Kolansky y Moore, 1972). Después de una dosis media, los efectos mentales son fácilmente cuantificables y medibles durante unas horas, generalmente no más allá de 4-6 horas (Hollister 1986a, 1988a). Algunos estudios describen que los efectos cognitivos permanecen más allá de 24 horas, incluso después de una única dosis fumada o ingerida por vía oral (Fehr y Kalant, 1983; Institute of Medicine, 1982). Los niveles venosos de THC o de otros cannabinoides correlacionan mal con la intensidad y el tipo de intoxicación (Agurell y cols., 1986; Barnett y cols., 1985; Huestis y cols., 1992a).

14.4.2. Efectos mentales adversos

La mayoría de los efectos mentales adversos suelen aparecer tras consumos prolongados de cannabis, aunque algunos trastornos, tales como las crisis de ansiedad, pueden aparecer en consumidores noveles.

El uso crónico o, en ocasiones, el uso aislado en sujetos sensibles, inexpertos o predispuestos produce episodios breves de ansiedad, pánico, trastornos disfóricos, depresivos o maniformes, despersonalización y desrealización, conductas bizarras y autoheteroagresivas, delirios (generalmente del tipo autoreferencial) o alucinaciones (más frecuentemente de tipo visual) (Institute of Medicine, 1982; Fehr y Kalant, 1983; Negrete, 1984; Hollister 1986a, 1988a; Adams y Martin, 1996). Dependiendo de la mezcla de síntomas y de la conducta, dicho estado ha sido denominado como reacción aguda de pánico, delirium tóxico, estado paranoide agudo o manía aguda (Rottamburg y cols., 1982). Dicho trastorno suele tener un comienzo agudo (comienza poco después de terminar de consumir un porro) o más despacio (de 1 a 2 horas) tras el uso por vía oral, y suele remitir completamente en pocas horas o pocos días, sin otro tratamiento que un entorno tranquilizador y el aseguramiento por parte de personas conocidas de que los síntomas están causados por la marihuana (“mal viaje”).

Síndrome amotivacional

El uso crónico de marihuana se ha asociado con un estado caracterizado por apatía y pérdida de motivación, con deterioro en los rendimientos académicos y cambios en la conducta (llamado “síndrome amotivacional”) (Pope *y cols.*, 1995). La explicación y los mecanismos para dicha asociación aún no están bien establecidas ya que parece que los pacientes que lo presentan muestran una serie de rasgos previos similares a los que se describen como propios de este síndrome, o sea, que el cannabis no provocaría más que un aumento en la intensidad de dichos rasgos.

¿Dependencia de cannabis?

Otro aspecto ampliamente debatido hasta hace poco tiempo es si el consumo de cannabis provocaba dependencia. Los signos y síntomas de abstinencia aparecen en pocas horas tras el abandono del consumo, en sujetos incluidos en estudios clínicos (Duffy y Milin, 1996; Mendelson *y cols.*, 1984b). Se ha producido un síndrome de abstinencia en tan sólo 5 días de consumo, en pocas dosis pero repetidas, en estudios doble ciego con placebo (Jones *y cols.*, 1981) y el consumo de THC aminora o hace desaparecer los síntomas. Los síntomas típicos son cansancio, diarrea, insomnio, irritabilidad, sudoración, salivación, náuseas, aumento de la temperatura corporal, anorexia, pérdida de peso, temblor, trastorno de rebote en los ciclos de fase REM y trastornos subjetivos en el sueño. Generalmente los síntomas desaparecen en 24-48 horas, pero los trastornos del sueño permanecen en ocasiones durante semanas.

Últimamente ha aparecido el primer intento de evaluar el grado de dependencia de los consumidores de cannabis a través de un cuestionario estandarizado, el Marijuana Craving Questionnaire (Heishman *y cols.*, 2001), que ha demostrado ser un instrumento útil en la validación del síndrome de abstinencia a cannabis.

Deterioro cognitivo

No está claro que sucede con los sujetos que han consumido cannabis durante un largo período de tiempo y con consumos de 2-3 veces al día. En estudios realizados con consumidores de estas características se han observado disminución en el rendimiento de test psicológicos que miden las capacidades cognitivas, por ejemplo la memoria (Solowji, 1999). La polémica surge en cuanto a si dicho deterioro es reversible tras el abandono del cannabis. Ensayos clínicos con escaso número de sujetos han encontrado que sí recuperan el nivel de funcionamiento premórbido tras la abstinencia, con reaparición de los efectos tras la vuelta al consumo, aunque parece que existe un deterioro sutil en determinadas capacidades cognitivas no reversible tras periodos prolongados de abstinencia (Núñez Domínguez, 2001).

Efectos en fetos de madres consumidoras

Otro aspecto que no podemos olvidar es el efecto que los cannabinoides provocan en embriones de mujeres embarazadas. Se han publicado estudios en animales que demuestran que los fetos afectados por el consumo de cannabis de sus madres

presentan importantes alteraciones en la homeostasis de diversos neurotransmisores (el más estudiado es la dopamina) y en sus receptores (Fernández Ruiz *y cols.*, 1996), algunas de las cuales no son reversibles con el paso del tiempo. En un estudio canadiense en el mismo sentido llevado a cabo en humanos (Fried *y cols.*, 1998) se ha observado que existe una alternancia temporal en la aparición de dichas alteraciones: tras un periodo inicial hasta los 4-5 años donde se observan fallos en las capacidades cognitivas, aparece un periodo “asintomático” que llega hasta los 11-12 años, donde reaparecen de nuevo las alteraciones cognitivas, a las que se suman problemas en el control de impulsos y trastornos de conducta e irritabilidad.

Relación con otros trastornos psiquiátricos

No está claro que el cannabis pueda desencadenar la aparición de trastornos afectivos (manía o depresión) o esquizofrenia (Institute of Medicine, 1982; Fehr y Kalant, 1983; Hollister, 1986*a*, 1988*a*; Gruber y Pope, 1994). Estudios recientes sostienen que el consumo de cannabis es un factor de riesgo para aquellos sujetos que presenten ciertos rasgos de personalidad o con antecedentes familiares de trastornos psicóticos (Linzsen *y cols.*, 1994): su consumo puede conducir a estos sujetos a una psicosis crónica. También ha sido descrito un estado psicótico con síntomas esquizofrénicos y maníacos con una duración de semanas o meses, la llamada “psicosis cannábica” (Ghodes, 1986), cuya existencia está en discusión (Thomas, 1993), aunque estudios recientes parecen confirmar su existencia (Núñez Domínguez y Gurpegui, 2002), que puede cronificarse si se mantiene el consumo, lo cual sucede cuando el consumidor continúa consumiendo con la esperanza de que esta sustancia le libere de los síntomas que padece.

Recientemente se ha intentado aplicar un modelo de vulnerabilidad a los sujetos consumidores de cannabis para explicar porqué un sujeto previamente sano que consume cannabis continúa con el consumo aunque haya presentado un trastorno psicótico. Dicho modelo es conocido como el modelo “vulnerability-stress-coping” (Hambrecht, 1999), que se explica de la siguiente manera: un sujeto comienza con el consumo para superar ciertas dificultades presentes en sus actividades cotidianas; el consumo aumenta el nivel de vulnerabilidad hacia la aparición de una psicosis y, a la vez, provoca la aparición de un cierto nivel de estrés psicosocial, que unido al consumo, provoca el desarrollo de una esquizofrenia. Por último el consumidor continúa consumiendo con la esperanza de que el cannabis le libere bien de las sensaciones desagradables provocadas por su enfermedad (delirios, alucinaciones, aislamiento social), bien para minimizar los efectos que el tratamiento farmacológico le produce.

La marihuana empeora claramente la esquizofrenia (Negrete *y cols.*, 1986). Anteriormente hemos hablado de las motivaciones del consumo entre esquizofrénicos y hemos mencionado el hecho de que el cannabis inicialmente puede provocar una mejoría en parte de la sintomatología esquizofrénica. Pero la tolerancia suele aparecer rápidamente y, aplicando el modelo citado más arriba, el sujeto aumenta el consumo para aliviar síntomas, lo que provoca un aumento en la sintomatología llamada positiva de la esquizofrenia, o sea, delirios y alucinaciones, lo que a su vez conduce a problemas en diversas áreas de su vida, como son los conflictos sociales (aumento de la auto/heteroagresividad (Martínez Arévalo *y cols.*, 1992), mayor nú-

mero de ingresos hospitalarios, abandono del tratamiento (Pristach y Smith, 1990), peor respuesta a los tratamientos psicofarmacológicos (Bowers y cols., 1990), etc.), todas ellas señales de un progresivo deterioro en la evolución del trastorno y de un peor pronóstico vital (Núñez Domínguez, 1997).

14.5. Conclusiones

El cannabis es la droga ilegal más consumida en el mundo occidental y posee entre la mayoría de los consumidores la imagen de “droga blanda y poco peligrosa”. Sin embargo son muchos los peligros potenciales de su consumo indiscriminado, no sólo mentales, sino también a nivel físico, algunos de ellos irreversibles a pesar del abandono del consumo (por ejemplo, deterioro cognitivo, aparición de esquizofrenias, etc.), si bien es cierto que en la mayoría de dichos casos tales consecuencias aparecen tras consumo prolongados.

Bibliografía

- Adams IB y Martin BR (1996) Cannabis: Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. **91**(11):1585-1614.
- Agurell S, Dewey WL y Willett RE, eds. (1984) *The Cannabinoids: Chemical, Pharmacologic, and Therapeutic Aspects*. New York: Academic Press.
- Bachman J y Reese TJ (1979) Personality correlates of cannabis dependence. *Add. Behav.* **4**:361-371.
- Barnett G, Licko V y Thompson T (1985) Behavioral pharmacokinetics of marijuana. *Psychopharmacol.* **85**(1):51-56.
- Benowitz NL y Jones RT (1977) Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on drug distribution and metabolism: Antipyrine, pentobarbital and ethanol. *Clin. Pharmacol. Ther.* **22**(3):259-268.
- Benowitz NL y Jones RT (1981) Cardiovascular and metabolic considerations in prolonged cannabinoid administration in man. *J. Clin. Pharmacol.* **21**:214S-223S.
- Bowers MB Jr., Mazure CM, Nelson JC y Jatlow (1990) Psychotogenic drug use and neuroleptic response. *Schiz. Bull.* **16**(1):81-85.
- Dixon L, Hass G, Weiden P, Sweeney J y Frances AJ (1991) Drug abuse in schizophrenic patients: clinical correlates and reason for use. *Am. J. Psychiatry.* **148**(2):224-229.
- Duffy A y Milin R (1996) Case study: Withdrawal syndrome in adolescent chronic cannabis users. *J. Am. Acad. Child. Adolesc Psychiatry.* **35**(12):1618-1621.
- Fehr K y Kalant H, eds. (1983) ARF/WHO Scientific Meeting on Adverse Health and Behavioral Consequences of Cannabis Use (1981: Toronto, Canada) Cannabis and Health Hazards: Proceedings of an ARF/WHO Scientific Meeting on Adverse Health and Behavioral Consequences of Cannabis Use. Toronto, Canada: Addiction Research Foundation.
- Fernández Ruiz JJ, Romero J, García L, Gracia-Palomero E y Ramos JA (1996) Dopaminergic neurons as neurobiochemical substrates of neurobehavioral effects of marijuana: Developmental and adult studies. En: Beninger, Palomo y Archer, eds. *Dopamine diseases states*. Ed CYM, Madrid.

- Fried PA, Gmora S y Watkinson BHR (1998) Prenatal marihuana exposure and its putative impact upon executive functioning in offsprings- A 16 year prospective study. Ponencia presentada en el 1998 ICRS Annual Meeting, Montpellier, Julio 1998.
- Ghosh AH (1986). Cannabis psychosis. *Br. J. Addict.* **81**:473-478.
- Gruber AJ y Pope HG (1994) Cannabis psychotic disorder: Does it exist? *Am. J. Addict.* **3**(1):72-83.
- Hambrecht M (1999) Cannabis, vulnerability and the onset of schizophrenia: An epidemiological perspective. Ponencia presentada en la Inaugural Cannabis and Psychosis Conference, Melbourne, 16-17 Febrero.
- Heishman SJ, Singleton EG, Ligouri A, Trotman AJ-M, Zahir M y Moolchan ET (2001) Marijuana Craving Questionnaire: Development and validation. 2001 Symposium on the Cannabinoids, Madrid, 28-30 Junio.
- Herning RI, Hooker WD y Jones RT (1986) Tetrahydrocannabinol content and differences in marijuana smoking behavior. *Psychopharmacol.* **90**(2):160-162.
- Hollister LE (1986a) Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* **38**(1):1-20.
- Hollister LE (1986b) Interactions of cannabis with other drugs in man. In: Braude MC, and Ginzburg HM, eds. Strategies for Research on the Interactions of Drugs of Abuse. National Institute on Drug Abuse Research Monograph 68. DHHS Pub. No. (ADM)86-1453. Washington, DC: Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off. pp. 110-116.
- Hollister LE (1988a) Cannabis-1988. (Literature review). *Acta Psychiatr. Scand.* (Suppl). **78**(345):108-118.
- Huestis MA, Henningfield JE y Cone EJ (1992a) Blood Cannabinoids. 1. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THC COOH during and after smoking marijuana. *J. Anal. Toxicol.* **16**(5):276-282.
- Huestis MA, Sampson AH, Holicky BJ y Henningfield JE (1992b) Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* **52**(1):31-41.
- Institute of Medicine (1982) Division of Health Sciences Policy. Marijuana and Health: Report of a Study by a Committee of the Institute of Medicine, Division of Health Sciences Policy. Washington, DC: National Academy Press.
- Jones RT (1987) Drug of abuse profile: Cannabis. *Clin Chem.* **33**(11 Suppl):72B-81B.
- Jones RT, Benowitz NL y Herning RI (1981) Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence. *J. Clin. Pharmacol.* **21**:143S-152S.
- Kelly P y Jones RT (1992) Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users. *J. Anal. Toxicol.* **16**:228-235.
- Khantzian EJ (1985) The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. *Am. J. Psychiatry.* **142**:1259-1264.
- Kolansky H y Moore WT (1972) Toxic effects of chronic marijuana use. *JAMA.* **222**:35-41.
- Linzsen DH, Dingemans PM y Lenior ME (1994) Cannabis abuse and the course of recent-onset schizophrenic disorders. *Arch. Gen. Psychiatry.* **51**:273-279.
- Martínez Arévalo MJ, Calcedo Ordóñez A, Varo Prieto JR y Peralta Rodrigo C (1992) Esquizofrenia, cannabis y conflictos con la ley. *Anales de Psiquiatría.* **8**(9):358-361.
- Maykut MO (1985) Health consequences of acute and chronic marijuana use. *Pr. Neuropsychophar. Biol. Psychiatry.* **9**:209-238.
- Mendelson JH, Mello NK, Lex BW y Bavli S (1984b) Marijuana withdrawal syndrome in a woman. *Am. J. Psychiatry.* **141**(10):1289-1290.
- Moreau JJ (1845) Du haschich et de l'aliénation mental
- Negrete JC (1984, Septiembre) Clinical psychiatric complications of cannabis use: an update. Marihuana 84 Proceeding of the Oxford Symposium on cannabis. Oxford., pag 581-592.

- Negrete JC, Knapp WP, Douglas DE y Smith WB (1986) Cannabis affects the severity of schizophrenic symptoms: results of a clinical review. *Psicol. Med.* **16**:000-000.
- Núñez Domínguez LA (1997) Cannabis y psicosis. Relaciones etiopatogénicas. *Adicciones.* **9**(1):129-143.
- Núñez Domínguez LA (1998) Consumo de cannabis en sujetos esquizofrénicos. *Adicciones.* **10**(3):239-247.
- Núñez Domínguez LA (2001) Deterioro cognitivo tras consumo de cannabis. *Rev. Esp. Neurol.* vol. **33**(5):482-486.
- Núñez Domínguez LA y Gurpegui Fernández de Legaria M (2002) Cannabis-induced psychosis: a cross-sectional comparison with acute schizophrenia. *Act. Psych. Scand.* (en prensa).
- Pope HG Jr. y Yurgelun-Todd D (1996) The residual cognitive effects of heavy marijuana use in college students. *JAMA.* **275**(7):521-527.
- Pristach CA y Smith CM (1990) Medication compliance and substance abuse among schizophrenics patients. *Hosp. Comm. Psychiatry.* **41**(12):1345-1348.
- Rottamburg D, Ben-Arie O, Robins AH, Teggin A y Elk R (1982) Cannabis-associated psychosis with hypomanic features. *Lancet.* **18**:1364-1366.
- Solowji N (1999) Cannabis and cognitive functioning. International Monographs in the Addictions. Cambridge University Press.
- Thomas H (1993) Psychiatric symptoms in cannabis users. *Br. J. Psychiatry.* **163**:141-149.
- Treffert DA (1978) Marijuana use in schizophrenia: a clear hazard. *Am. J. Psychiatry.* **135**(10):1213-1215.

15.1. Introducción

Fumar preparaciones cannábicas (porros) es una fuente potencial de problemas. De ellos, los más importantes en clínica son la adicción -fumar un número de porros (p.ej. 10 o más) cada día durante meses (p.ej. 6 o más)- en presencia o ausencia de otros consumos de tóxicos, y la exacerbación de la esquizofrenia y demás psicosis. Es irrelevante que todavía se minimicen los riesgos por consumo de cannabis: hace pocas décadas sucedió lo mismo con el tabaco, pero la opinión pública ha tenido que reconocer por fin lo deletéreo de su consumo. Hasta el punto de que actualmente en clínica se considera la nicotinoddependencia como el paradigma de la adicción, del mismo modo que la heroínoddependencia lo fue en los años ochenta; el alcoholismo ha seguido siendo también protagonista desde los primeros tiempos de la adictología. De la experiencia histórica con el tabaco deberíamos aprender a no repetir los mismos errores y convencernos de que fumar porros puede ser peligroso. Esperemos que jamás se industrialice su producción y distribución para que no se reedite con el cannabis la hecatombe -hay que llamar las cosas por su nombre- en salud pública que ha supuesto la producción masiva de preparaciones tabáquicas, los cigarrillos, a lo largo de la segunda mitad del siglo XX.

Se resume seguidamente la guía de tratamiento en consumo de cannabis y problemas relacionados. Para una mayor profundización en estos aspectos terapéuticos y en otros no menos interesantes -sociales, antropológicos, éticos, ecológicos...- remitimos a la bibliografía de referencia en español que cierra el capítulo.

15.2. Consumo de cannabis y trastornos asociados

El trastorno por dependencia y el de abuso configuran, según la clasificación psiquiátrica americana (DSM-IV) imperante, los trastornos por uso de sustancias en sentido estricto. Otros importantes trastornos -intoxicación, delirium, psicosis

cannábica con delirio o con alucinaciones, ansiedad por cannabis y trastornos relacionados con cannabis no especificados- configuran los trastornos inducidos por cannabis. Al respecto, ante el cannabis no hay que ser terapéuticamente intervencionista de primera intención, pues los trastornos inducidos tienden a autolimitarse. Es útil tranquilizar verbalmente al afectado e incluso prescribir benzodiacepinas, a pesar del conocido riesgo adictivo y de que supongan un fácil refugio que aleje de afrontar el problema.

TRATAMIENTO EN CONSUMO DE CANNABIS

- Tratamiento de los trastornos inducidos
- Tratamiento de los trastornos por consumo: cesación

El abordaje terapéutico de la dependencia y abuso de dicha sustancia constituye el tratamiento de los trastornos por consumo de cannabis: es el tratamiento de cesación anticannábico, similar al antitabáquico pero de rasgos propios. Esta propuesta española de cesación en cannabis se considera pionera.

○ TRATAMIENTO DE LOS TRASTORNOS INDUCIDOS

- ◆ 1ª opción: no intervenir
- ◆ Tranquilización verbal (talk down)
- ◆ Tranquilizar con benzodiacepinas
 - Riesgo adictivo
 - Refugio y no afrontamiento
- ◆ Indicación de antipsicóticos

15.3. Tratamiento para cesar de fumar cannabis

Lo primero que hay que tener en cuenta es el tipo de expectativas del consumidor ante dicho consumo, condicionadas por el ambiente en que se contextualiza. En relación a esto debe recordarse que el cannabis está sujeto a prohibición legal, es decir, que se persigue su tenencia, producción y distribución. Al mismo tiempo, hay gran tolerancia social ante el consumo de cannabis, que se considera droga blanda, y hay contextos legales en que se permite la posesión de cantidades

médicas para consumo propio. Por tanto, el cannabis o cáñamo, tercera droga más consumida del mundo tras el tabaco y el alcohol, se acerca a las pautas de consumo masivo de ambos. Un tercer aspecto a tener en cuenta es que quien consume cannabis puede hacerlo por la sustancia en sí, y al mismo tiempo aprovechar su efecto depresor central para neutralizar la toma previa de psicoestimulantes (cocaína, éxtasis, anfetaminas) o bien para alargar el efecto de la heroína. El efecto embriagante y a veces psicotomimético del cannabis puede ser deseable -no sólo hay interacciones farmacológicas no deseables, sino también las deseadas- para alguien en el contexto del consumo no moderado de alcohol, simplemente para “colocarse” más.

○ **TRATAMIENTO DE LOS TRASTORNOS POR CONSUMO: CESACIÓN**

- ◆ Expectativas y ambiente
- ◆ Prohibición legal, tolerancia social
 - Tabaco y cáñamo
- ◆ Interacciones farmacológicas deseadas (opciones)
 - Neutralizar psicoestimulantes
 - Prolongar efectos de heroína
 - Potenciar embriaguez alcohólica

15.4. Cuándo hay que indicar tratamiento

CESACIÓN DE FUMAR CANNABIS

- ◆ Indicada en pacientes duales
- ◆ Dificultades
 - Refuerzo primario de la sustancia
 - Refuerzo secundario del grupo
 - Obstáculos motivacionales
 - Distorsión atributiva
- ◆ Intervención
 - Ambulatoria, psicopedagógica
 - Estilo semidirectivo
 - Prevención

El tratamiento de cesación de fumar preparados cannábicos debería indicarse especialmente en pacientes con diagnóstico dual, en los que al mismo tiempo coexiste el abuso/dependencia de cannabis y trastornos mentales como esquizofrenia. Esta grave enfermedad se considera que es el principal riesgo para la salud atribuible al consumo de cannabis. Haya o no comorbilidad, la dificultad de abstenerse de la droga reside en la propia sustancia (refuerzo primario), la influencia de los compañeros (refuerzo secundario), y en las bases motivacionales y cognitivas del consumo (p. ej., la individuación adolescente y la distorsión atributiva). Las intervenciones terapéuticas han de ser de tipo ambulatorio, educativo, de estilo firme pero flexible (semidirectivo), y de alcance preventivo.

Esquemáticamente suele diferenciarse entre la fase de desintoxicación, en los primeros días e incluso semanas, y la de deshabituación o de mantenimiento, que dura meses. En la primera se empieza por tranquilizar y dar ánimo al paciente anticipándole síntomas previsibles (deseo o craving, p. ej.). Si procede, el médico indicará antidepresivos: inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, bupropión y, en general, los de última generación por su buen perfil de tolerabilidad. Pueden indicarse benzodiacepinas con la usual cautela. Durante la fase de mantener la deshabituación, que dura meses, lo ideal es que el paciente reciba la mejor psicoterapia individual o grupal posible, con objetivos claros y técnicas adecuadas.

15.5. Cómo lograr la cesación

El objetivo es aumentar la conciencia del problema, desactivar prejuicios y falsas creencias, y generar expectativas de futuro. Técnicas disponibles son el counseling (psicoterapia en sesiones de treinta minutos, p. ej.), la entrevista motivacional (al modo de la utilizada para tratar el alcoholismo en atención primaria), el aprendizaje de destrezas sociales, la prevención de recaídas, y el contrato de contingencias (incentivar o desincentivar según resultados).

CESACIÓN DE FUMAR CANNABIS: TERAPIA INDIVIDUAL

- ◆ OBJETIVOS
 - Aumentar la conciencia de problema
 - Desactivar prejuicios y falsas creencias
 - Generar expectativas de futuro

- ◆ TÉCNICAS
 - Counseling
 - Entrevista motivacional
 - Entrenamiento en actividades sociales
 - Prevención de recaídas
 - Contrato de contingencias

**CESACIÓN DE FUMAR CANNABIS:
TERAPIA GRUPAL**

- ◆ VENTAJAS
 - Rentabiliza las intervenciones
 - Grupo pro salud vs grupo pro consumo

- ◆ INCONVENIENTES
 - No hay demanda suficiente
 - Diversidad de edades
 - Diversidad de problemáticas

Lo expuesto, derivado del abordaje terapéutico individual, vale también para la terapia de grupo. La ventaja obvia es que ésta rentabiliza las intervenciones profesionales. En el terreno de las adicciones, con una marcada dimensión social y de grupos de pertenencia, otra ventaja estriba en que el grupo terapéutico se contrapone al grupo en que se consume. El inconveniente principal es que son contados los consumidores de cannabis que demandan terapia de cesación, al modo en que hace algunos años eran pocos los tabaquistas en busca de tratamiento. Otro problema es que a veces no es fácil la interacción de adolescentes y adultos en un mismo grupo; estos últimos demandan más ayuda, con diferencia, que los primeros, pero estos son más numerosos como consumidores de cannabis. Un tercer inconveniente bien conocido es que conjugar grupalmente los diversos problemas no siempre llega a ser posible o terapéuticamente favorable.

15.6. Papel de los familiares

Dada la edad juvenil de los afectados ha de haber intervención terapéutica en las familias, que además son las que suelen generar la demanda. Siempre se asesorará contextualizando, no dramatizando. Es más útil incidir en los cambios de conducta observados que fomentar las actitudes detectivescas de padres escudriñando las pertenencias del hijo en busca de la droga. El terapeuta ha de medir el caudal de información para dar opción a escuchar, orientar y a sucesivas intervenciones dentro de una continuidad; en una primera entrevista no puede solucionarse todo. Quienes fuman, sean dependientes de nicotina o de cannabinoides, deberían hallar interlocutores sociosanitarios capaces de informar con rigor técnico sobre los riesgos de ambos consumos para la salud. No se trata, por supuesto, de que el terapeuta muestre actitudes del tipo poner el grito en cielo, pero tampoco de que exhiba actitudes demagógicamente liberales, más propias de la especulación antropológica que del auxilio sanitario.

El papel de la familia es importante en terapia de adolescentes, pero no debiera ser determinante. Al igual que en cesación del tabaco, el adolescente ha de sentirse protagonista único de su motivación de abstenerse de fumar porros. Suele tener la

ventaja de que nadie más en casa los fuma, cosa que no es así para el tabaco. Por tanto, el adolescente fumador de porros suele librarse del modelado negativo parental directo (padres que fuman tabaco), que sí influye claramente en el adolescente fumador de cigarrillos. En el caso del cannabis hay, por supuesto, modelado parental negativo indirecto: se imita la forma de autoadministración del psicotrópico, o sea fumar. Que sea cáñamo y no tabaco lo que se fume le permite al adolescente entrar en contraste con los padres, enfrentarse a ellos para diferenciarse y sentirse más él mismo. La connotación provocadora de consumir algo ilícito se adecua perfectamente a este propósito individualizador, bien establecido en psicología juvenil. Este refuerzo positivo que emana del halo transgresor es uno de los principales obstáculos motivacionales en terapia de cesación con adolescentes y adultos jóvenes.

CESACIÓN DE FUMAR CANNABIS: INTERVENCIÓN FAMILIAR

- ◆ Hay demanda de información por parte de los progenitores
- ◆ ASESORAMIENTO
 - Contextualizar y desdramatizar
 - Analizar cambios de conducta
 - No a las actitudes detectivescas
 - No al exceso de información
 - Orientar el caso
 - Dar opción a sucesivas intervenciones

15.7. Controlar la sobriedad

Finalmente, una tecnología a ofertar en terapia de cesación anticannábica es que los pacientes puedan disponer de controles de orina para detección de cannabinoides y de cuantos psicotóxicos se haya acordado evitar. Con ello se logra monitorizar la abstinencia del consumo de forma suficientemente objetiva. Es básico no olvidar la posible persistencia de cannabinoluria durante semanas después de abstenerse de fumar preparaciones cannábicas, en razón de la farmacocinética lenta de los cannabinoides, es decir, de principios activos como el tetrahidrocannabinol, fundamentalmente. Desconocer este hecho podría llevar a que algún paciente se sintiera injustamente reprochado, por asimilación de un consumo remoto al consumo actual/reciente que quebranta el compromiso de abstinencia adquirido. Para obviar este tipo de falsos positivos se ha preconizado el empleo de urinálisis capaces de diferenciar entre cannabinoides de distinta cinética. En la práctica no es imprescindible. Basta con que el terapeuta no pierda de vista algo consustancial al saber médico: que la clínica prevalece sobre el laboratorio. Está bien que los análisis de orina den negativo, por supuesto, pero lo importante es que quien trata sepa

valorar lo que dice y hace el paciente a lo largo del tiempo y sepa administrar los refuerzos positivos y negativos con el mayor sentido de oportunidad y proporcionalidad que le sea posible.

**CESACIÓN DE FUMAR CANNABIS:
CONTROLES DE ORINA**

- ◆ Cannabinoluria: puede persistir semanas
- ◆ No hay porqué juzgar un consumo remoto
- ◆ Urinálisis específicos para distinguir entre cannabinoides de diferente farmacocinética

Bibliografía

- Bobes J y Calafat A eds. (2000) *Monografía Cánnabis. Adicciones (Socidrogalcohol)*. vol. 12, supl. 2, 330 págs.
- Cabrera Forneiro J y Ramos Atance JA eds. (1999) *Cánnabis: ¿hasta dónde!* Comunidad de Madrid/Harcourt, 230 págs.
- Solé Puig J y Ramos Atance JA eds. (2001) *Cannabinoides: aspectos psiquiátricos y bioquímicos*. Ediciones Rol, Barcelona, 240 págs.

