

Trabajo de Fin de Máster  
Máster en Neurociencias

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL RIMONABANT SOBRE EL  
IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A  
 $\Delta$ 9-TETRAHYDROCANNABINOL (THC)  
A LAS 24 HORAS EN LA ULTRAESTRUCTURA DEL  
HIPOCAMPO Y LA MEMORIA**

Autor:

Aitor Meira Sáez

Directoras:

Itziar Bonilla-Del Río

Nagore Puente Bustinza

*Departamento de Neurociencias  
Laboratorio de Pedro Grandes*



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 CANNABIS: USO RECREATIVO Y MEDICINAL</b> .....	1
<b>1.2 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y THC</b> .....	1
<b>1.3 HIPOCAMPO Y LA MEMORIA</b> .....	4
<b>1.4 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO: OPEN FIELD Y NORT</b> .....	5
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	6
<b>2.1 DECLARACIÓN ÉTICA</b> .....	6
<b>2.2 ANIMALES Y TRATAMIENTOS</b> .....	6
<b>2.3 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO</b> .....	7
<b>2.4 PREPARACIÓN MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b> .....	7
<b>2.5 ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL</b> .....	8
<b>2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	8
<b>3. RESULTADOS</b> .....	8
<b>3.1 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO</b> .....	8
<b>3.2 ANÁLISIS DE ULTRAESTRUCTURA</b> .....	9
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	14
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	16

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CANNABIS: USO RECREATIVO Y MEDICINAL

El cannabis es una droga depresora del sistema nervioso ampliamente utilizada a nivel mundial, cuyo consumo está ascendiendo durante los últimos años. Actualmente se trata de la droga ilícita más comúnmente utilizada, presentando 192 millones de consumidores de entre 15 y 64 años a nivel mundial (United Nations Office on Drugs and Crime WDR, 2020).

Pese a ser utilizada principalmente con fines recreativos, se han descrito múltiples aplicaciones terapéuticas relacionadas a los cannabinoides, en parte por sus propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras (Bahr *et al.*, 2006; Centonze *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2011). Entre sus aplicaciones se ha descrito su uso para el tratamiento de la esclerosis múltiple, del glaucoma, de la enfermedad de Alzheimer, del dolor crónico o de náuseas y vómitos, entre otras (Campbell & Gowran, 2007; Fraguas-Sánchez & Torres-Suárez, 2018; Maurya & Velmurugan, 2018).

Sin embargo, el potencial uso medicinal del cannabis se ve limitado por los efectos secundarios que produce su consumo sobre múltiples procesos cognitivos, como la atención, el aprendizaje verbal, la memoria de trabajo y otras funciones de la memoria (Puighermanal *et al.*, 2012), efectos en el comportamiento que han sido ampliamente estudiados tanto en modelos animales como en humanos (Broyd *et al.*, 2016; Varvel *et al.*, 2001, Wise *et al.*, 2009). Otro factor a tener en cuenta es que múltiples estudios relacionan la exposición aguda y crónica a esta sustancia con la esquizofrenia y con enfermedades psicóticas (Marconi *et al.*, 2016; Vallersnes *et al.*, 2016). Esto se une al hecho de que el uso del cannabis se da principalmente dentro de la población más joven, alcanzando su máximo en los adolescentes de entre 15 y 16 años (United Nations Office on Drugs and Crime WDR, 2020), cuyo cerebro se encuentra en plena etapa de desarrollo, y por lo tanto en un periodo sensible (Meruelo *et al.*, 2017).

## 1.2 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y THC

El principal compuesto psicoactivo del cannabis es el  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC), el cual es capaz de generar los efectos secundarios previamente mencionados al interactuar con el sistema endocannabinoide fisiológico del cuerpo. Este sistema actúa a modo de regulador de múltiples procesos biológicos, y a nivel cerebral modula las transmisiones sinápticas de manera retrógrada (Cachope *et al.*, 2012).

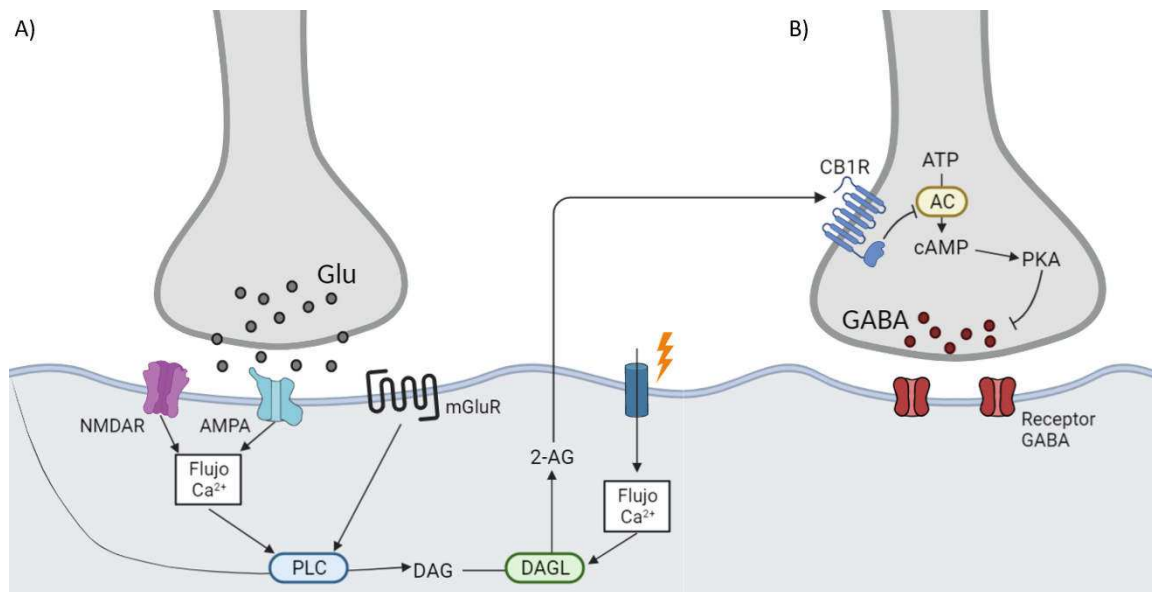
Los receptores de Cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), ambos acoplados a proteínas G, son los principales receptores que conforman el sistema endocannabinoide, siendo el receptor CB1 el más abundante a nivel del sistema nervioso central (Puighermanal *et al.*, 2012). Este se encuentra predominantemente localizado en terminales presinápticos inhibidores, y en menor medida en excitadores (Kawamura *et al.*, 2006), aunque también se ha descrito en astrocitos y en mitocondrias (Bernard *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2012). Los endocannabinoides anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) son sustancias lipídicas agonistas de los receptores CB1 y CB2 a nivel biológico, que actúan principalmente a modo de inhibidores retrógrados en las sinapsis (Cristino *et al.*, 2019). Su síntesis está mediada por las enzimas N-acetiltransferasa y fosfolipasa D (PLD)

en el caso de la AEA, y por la fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol lipasa (DAGL) en el caso del 2-AG (Puighermanal *et al.*, 2012).

La biosíntesis del endocannabinoide 2-AG en la neurona postsináptica es un proceso inducido principalmente por 2 eventos (Fig. 1a). Por un lado, la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje por una despolarización o un potencial de acción postsinápticos dan lugar a un aumento en la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual es amplificada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promoviendo finalmente la producción de 2-AG. Por otro lado, la estimulación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) por la liberación de glutamato desde un terminal sináptico, también es capaz de estimular la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana para la biosíntesis del 2-AG (Cachope *et al.*, 2012; Cristino *et al.*, 2019). En ambos casos la biosíntesis se da por medio de las enzimas PLC y DAGL. Además, se sabe que el receptor ionotrópico del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) también provoca la síntesis de endocannabinoides (Brown *et al.*, 2003). Tras su liberación desde la neurona postsináptica, los endocannabinoides interaccionan con los receptores CB1 presinápticos, suprimiendo la liberación de neurotransmisores (Cachope *et al.*, 2012), modulando así procesos de plasticidad sináptica a corto y largo plazo, como la depresión a corto (STD) y largo plazo (LTD) de sinapsis excitadoras o inhibitoras, o procesos de potenciación a largo plazo (LTP; Cristino *et al.*, 2019).

Se han descrito múltiples cascadas de señalización resultantes de la activación del receptor CB1 a nivel presináptico. Uno de los mecanismos mejor caracterizados, es la inhibición de la adenil ciclasa mediada por el grupo Gi/o de las proteínas G acopladas a receptor CB1 (Fig. 1b). Esta inhibición desemboca en la reducción de la producción de AMP cíclico (cAMP) que promueve un detrimento de la actividad de la proteína kinasa A (PKA; Puighermanal *et al.*, 2012). Finalmente, estos cambios generan un descenso en la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio intracelular y un aumento en la permeabilidad al potasio que reduce la liberación de neurotransmisores presinápticos (Cachope *et al.*, 2012). Esta cascada de señalización es característica de la depresión a largo plazo de sinapsis inhibitoras mediada por endocannabinoides (Chevalleyre *et al.*, 2007). Debido a que existen diferentes cascadas de señalización que están moduladas por la activación del receptor CB1, los efectos que puede provocar abarcan un rango muy amplio (Cachope *et al.*, 2012). Por ejemplo, otra vía de señalización acoplada al receptor CB1 es la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK), una proteína participe de la regulación de las integrinas y su adhesión al citoesqueleto de actina, que es un regulador clave en la plasticidad sináptica (Derkinderen *et al.*, 1996; Puighermanal *et al.*, 2012).

Sin embargo, como se ha mencionado, los receptores CB1 no se expresan únicamente en neuronas presinápticos. Por ejemplo, se ha descrito que los receptores CB1 localizados postsinápticamente median la inhibición lenta de interneuronas neocorticales (Marinelli *et al.*, 2008). Por otro lado, los receptores CB1 en mitocondrias son capaces de inhibir la cadena de transporte electrónico, afectando directamente al metabolismo de las neuronas (Bénard *et al.*, 2012).



**Figura 1. Funcionamiento del sistema endocannabinoide.** A) Ruta de activación de la biosíntesis del endocannabinoide 2-AG. La liberación de glutamato en la hendidura sináptica promueve la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), y los receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDAR) y ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que estimulan la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana a diacilglicerol por medio de la enzima fosfolipasa C (PLC). El diacilglicerol es después convertido a 2-araquidonilglicerol (2-AG) por medio de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL). Una despolarización escalonada o un potencial de acción postsináptico también puede inducir una afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de calcio dependientes de voltaje. Esta señal es luego amplificada por una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por receptores metabotrópicos, que en última instancia induce la síntesis de 2-AG por la misma vía. (B) Mecanismo de depresión a largo plazo mediado por sistema endocannabinoide. El 2-AG liberado desde el dominio postsináptico llega hasta el dominio presináptico donde activa los receptores de Cannabinoides tipo 1 (CB1) de un terminal GABAérgico. Esta activación resulta en la inhibición de la enzima adenilil ciclasa (AC) lo cual genera una reducción de la activación de la proteína quinasa A (PKA). Se cree que la menor actividad de PKA reduce la fosforilación de un mensajero regulador presináptico, provocando una reducción a largo plazo en la liberación de neurotransmisores desde el terminal (Cachope *et al.*, 2012; Cristino *et al.*, 2019; Puighermanal *et al.*, 2012).

El THC tiene la capacidad de actuar como agonista parcial del receptor de Cannabinoides tipo 1 (CB1) y del receptor de Cannabinoides tipo 2 (CB2), desregulando así el estado fisiológico del cuerpo. Múltiples estudios demuestran que las alteraciones provocadas por el cannabis en la plasticidad sináptica, la memoria y en el comportamiento están mediados por la interacción entre el THC y el receptor CB1 (Busquets-Garcia *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2012; Wise *et al.*, 2009). Por ejemplo la administración crónica de THC produce tolerancia a los efectos mediados por cannabinoides por medio del descenso de receptores CB1 y la desensibilización de los mismos por el desacoplamiento de las proteínas G o por procesos de internalización (Fan *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2008). En línea con estos resultados, se ha descrito que la exposición aguda del receptor CB1 al THC provoca su reducción en el CA1 del hipocampo (Bonilla-Del Río *et al.*, 2020). En otro estudio sobre la exposición crónica al THC durante la adolescencia, los ratones mostraron una hiperpolarización del potencial de membrana en reposo, una disminución en la cadencia de disparo sináptica y una disminución en la plasticidad sináptica de despolarización en las sinapsis glutamatérgicas de la corteza prefrontal prelámbica (Pickel *et al.*, 2019). Además, se han visto alteraciones a nivel ultraestructural en distintas regiones del cerebro mediadas por el receptor CB1.

Por ejemplo, en ratones CB1 KO, la ausencia del receptor CB1 en terminales glutamatérgicos parece afectar a la ultraestructura cerebral incrementando la densidad de espinas dendríticas y la arborización dendrítica en el hipocampo, mientras que esta ausencia en terminales GABAérgicos provoca el efecto contrario, disminuyéndolos (Monory *et al.*, 2015). En un estudio reciente llevado a cabo en las células granulosas del cerebelo, se ha visto que la ausencia de receptor CB1 en los terminales de las fibras paralelas produce una serie de cambios ultraestructurales, como el aumento del tamaño de los terminales y una alteración en la distribución de las vesículas en la zona activa de los lóbulos espinocerebelosos V y vestibulocerebelosos X (Buceta *et al.*, 2019). Todos estos cambios mediados por el receptor CB1 podrían contribuir al efecto provocado sobre el comportamiento y la plasticidad sináptica por la exposición a THC.

### 1.3 HIPOCAMPO Y LA MEMORIA

Uno de los principales efectos del consumo de cannabis es la disrupción en los procesos de aprendizaje y la memoria (Lichtman *et al.*, 1995; Puighermanal *et al.*, 2009), los cuales están ampliamente relacionados con el hipocampo (Neves G *et al.* 2008). Esta región del cerebro presenta una alta densidad de receptores CB1 (Herkenham *et al.*, 1991), y se sabe que participa como mediadora de los efectos del THC sobre la memoria (Busquets-García *et al.*, 2018; Calabrese y Rubio-Casillas, 2018; Han *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que una exposición crónica al THC induce un descenso en la LTP hipocámpal que es dependiente al receptor CB1 (Fan *et al.*, 2010). Asimismo, se ha visto que la administración intrahipocámpal de THC altera funciones de la memoria por medio de una acción directa de los receptores CB1 en el hipocampo (Wise *et al.*, 2009).

Múltiples estudios apuntan a una desregulación entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria en el hipocampo como mecanismo subyacente a este deterioro provocado por los cannabinoides (Puighermanal *et al.*, 2012). Esta se vería impulsada por una mayor inhibición retrógrada de los terminales GABAérgicos respecto a los glutamatérgicos, debido a una mayor expresión del receptor CB1 y una mayor sensibilidad de los mismos al THC en los terminales inhibidores (Kawamura *et al.*, 2006; Laaris *et al.*, 2010). Además, se han propuesto diferentes mecanismos mediadores del efecto del THC para la memoria a corto y largo plazo. El THC altera la memoria a largo plazo por medio de la ruta mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), que aumenta la translación proteica dando lugar finalmente a los efectos de amnesia (Puighermanal *et al.*, 2009; Puighermanal *et al.*, 2013). Mientras que la memoria a corto plazo en el reconocimiento de objetos novedosos se ha visto que es alterada por un aumento en la fosforilación de la neurogranina hipocámpal dependiente de la fosfoquinasa C (Busquets-García *et al.*, 2018).

En concreto, la región CA1 del hipocampo juega un papel esencial en el efecto del cannabis sobre la disrupción de la memoria. Se ha demostrado que la exposición aguda al THC perjudica la memoria espacial por medio de la depresión a largo plazo (LTD) de sinapsis CA3-CA1, dependiente de la activación astrogliar de receptores CB1 de la capa CA1 (Han *et al.*, 2012). También se han observado alteraciones a nivel ultraestructural en la región CA1 del hipocampo bajo la exposición aguda al THC en ratones, mostrando un aumento en el número de espinas dendríticas y mitocondrias, y una disminución en el área de espinas dendríticas, terminales sinápticos, mitocondrias y astrocitos (Bonilla-Del Río *et al.*, 2020). En otro estudio se ha descrito

una disminución en la densidad de espinas dendríticas hipocampales bajo una exposición crónica al THC (Chen *et al.*, 2013). Debido a que el THC actúa como agonista de otros receptores del sistema endocannabinoide, se desconoce si estas alteraciones ultraestructurales se deben exclusivamente a la acción del receptor CB1. Una forma utilizada por múltiples estudios para atribuir los efectos observados a la interacción del receptor CB1 con el THC, es el uso del compuesto SR141716 (Rimonabant) como antagonista (Busquets-Garcia *et al.*, 2018; Kathmann *et al.*, 2001; Varvel *et al.*, 2001, Wise *et al.*, 2009). Al bloquear las interacciones del receptor se consigue revertir el efecto provocado por la administración de THC, y así confirmar el papel del CB1 en el proceso.

#### **1.4 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO: OPEN FIELD Y NORT**

La ansiedad o estrés de un animal puede ser un condicionante clave a la hora de analizar su comportamiento. Por ello es común utilizar diversas pruebas que evalúen este factor. La prueba Open Field (OF) es uno de los test más ampliamente utilizados para evaluar el comportamiento relacionado a la ansiedad en ratones (Kuniishi *et al.*, 2017). Consiste en colocar al ratón en medio de una caja, normalmente de cloruro de polivinilo (PVC), y permitirle explorar libremente el área por 5 minutos. Los ratones que están estresados presentan una menor actividad durante la prueba y pueden exhibir comportamientos estereotipados, como movimientos repetitivos e invariantes sin aparente objetivo (Kraeuter *et al.*, 2018). También es común que muestren thigmotaxis, una tendencia a moverse por las paredes de la caja, que es una consecuencia de la naturaleza de los ratones a evitar áreas abiertas y desconocidas (Wilson *et al.*, 1976). Este comportamiento es pronunciado en ratones que muestran signos de ansiedad, mientras que los ratones con menor ansiedad tienden a explorar más tiempo en las áreas centrales del OF (Kraeuter *et al.*, 2018).

El detrimento causado por el THC sobre los procesos cognitivos en ratones puede ser analizado por distintos tipos de pruebas de comportamiento. Entre ellas se encuentra la prueba de Reconocimiento de Objetos “Novel Object Recognition Test” (NORT), que es un ensayo comúnmente utilizado en investigación para el análisis de diversos aspectos del aprendizaje y la memoria en ratones (Busquets-Garcia *et al.*, 2018; Puighermanal *et al.*, 2013). En este estudio en concreto la prueba se realiza en un laberinto en forma de L (Lmaze). El NORT consta de 3 fases, habituación, “training” (T1) y “testing” (T2), de 9 minutos cada una. El objetivo de la fase de habituación es que el ratón se acostumbre al laberinto en el que se realizará la prueba. Después, durante la fase T1, se colocan dos objetos idénticos en cada brazo del laberinto, y se le permite al ratón explorar libremente para familiarizarse con el objeto. Finalmente, en la fase T2, uno de los 2 objetos idénticos se cambia por un objeto novedoso, y el ratón tiene que intentar discriminar el objeto novedoso del aprendido. La capacidad del ratón para discriminar ambos objetos se mide en base a las diferencias en los tiempos de exploración para cada uno durante la fase T2. La prueba se basa en la preferencia innata de los ratones por explorar lo novedoso, y permite estudiar fases individuales del proceso de la memoria y el aprendizaje. De esta manera al inyectar el tratamiento en los ratones inmediatamente después de la fase de entrenamiento, se puede analizar el efecto del mismo en los procesos de consolidación de la memoria (Lueptow, 2017).



## **1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En este estudio se analiza el impacto a corto plazo del THC sobre la memoria y la ultraestructura del Hipocampo en ratones y su dependencia respecto del receptor CB1. Para ello, se propone por un lado (i) evaluar el impacto de la exposición aguda del THC y el efecto de la co-administración de THC más Rimonabant (SR141716) a las 24 horas sobre la consolidación de la memoria en ratones, usando para ello la prueba Novel Object Recognition Test (NORT). Y por el otro, (ii) analizar los cambios a nivel de ultraestructura cerebral en la región CA1 del hipocampo de ratón trascurridas las 24 horas de la administración aguda con THC y THC más Rimonabant mediante el uso de microscopía electrónica.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 DECLARACIÓN ÉTICA**

Los protocolos de cuidado y uso de los animales fueron aprobados por el Comité de Ética para el Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco País (M20/2018/121) y estaban de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE) y la normativa española (Real Decreto 53/2013, BOE 08-02-2013). Se realizaron esfuerzos para minimizar el número y el sufrimiento de los animales.

### **2.2 ANIMALES Y TRATAMIENTOS**

El estudio se realizó con ratones macho de la cepa C57BL/6-N de 9 semanas de edad (20-26 g). Se emplearon 24 ratones, 6 por grupo experimental (Salino, THC, SR141716, THC-SR141716). Los ratones se mantuvieron aislados en jaulas estándares de Plexiglas (17 cm × 14.3 cm × 36.3 cm), bajo condiciones controladas a 22°C con ciclos 12:12 h de luz: oscuridad y con acceso a comida y bebida ad libitum. Las pruebas de comportamiento se realizaron durante las fases lumínicas del ciclo.

Los tratamientos se administraron por medio de inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 10 µL de disolución/ gr de animal. Los ratones tratados con THC recibieron una inyección i.p. de THC (5 mg/kg; THC-PharmGmbH, Dronabinol DAC, CAS Number: 1972-08-3, Batch: S19-007, Frankfurt, Germany) disuelto en 4% etanol, 4% Cremophor y 92% solución salina. Al grupo experimental tratado con Rimonabant se le inyectó SR141716 (1 mg/kg; SR141716A Tocris, CAS Number 158681-13-1, Batch: 4, USA & Canada) i.p disuelto en 10% DMSO, 0,1% Tween80 y 89,9% solución salina. Los ratones con tratamiento simultáneo de THC-Rimonabant recibieron una primera inyección i.p de SR141716 (1 mg/kg), y 20 minutos después una inyección i.p. de THC (5 mg/kg), bajo las mismas disoluciones. Los controles fueron inyectados i.p. con una disolución salina compuesta por 4% etanol, 4% Cremophor y 92% solución salina.

Los 24 ratones fueron anestesiados con ketamina/xilacina (100 mg/kg, i.p.) y perfundidos transcardiacamente con tampón fosfato salino 0,1 M (PBS), pH 7,4 por 20 s, seguido por una solución fijadora que contenía 4% de paraformaldehído, 0,2% de ácido pícrico y 0,1% de glutaraldehído en PBS por 10-15 mín. Acto seguido, los cerebros perfundidos fueron extraídos de los cráneos de los ratones y fijados por inmersión en la misma solución fijadora por 1 semana

(4°C). Finalmente fueron transferidos a una dilución 1:10 de la misma solución fijadora, donde se mantuvieron hasta que se seccionaron los tejidos.

## 2.3 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

6 ratones de cada grupo experimental participaron en las pruebas de comportamiento a lo largo de 4 días consecutivos. Se procuró que las horas de inicio de las pruebas coincidiesen durante los 4 días. Las inyecciones i.p. de los tratamientos se realizaron el día 3 de las pruebas de comportamiento, inmediatamente después de terminar la fase “Training” (T1) de la prueba NORT.

1. **Open Field** (día 1): Los ratones se colocaron en el centro de una caja cuadrada de PVC (40 x 40 x 42 cm), y se les permitió explorar el terreno durante 5 minutos.
2. **Novel Object Recognition Test (NORT)**: Los ratones se depositaron en el centro de un laberinto en forma de L con dos brazos de misma longitud (L maze), y exploraron el terreno durante 9 minutos. En la fase de habituación (día 2) el L maze se dispuso vacío. En la fase Training (T1, día 3), se colocaron dos objetos idénticos, uno al final de cada brazo del L maze. En la fase Testing (T2, día 4), uno de los dos objetos conocidos por el ratón se cambió por un objeto novedoso. La exploración de objetos se definió como la orientación de la nariz al objeto a una distancia de menos de 2 cm. Todos los objetos fueron probados previamente para evitar preferencias sesgadas. El aparato y los objetos se limpiaron con etanol (70%) antes del uso experimental y entre cada prueba con animales.

Se grabó todo el proceso de las pruebas de comportamiento con una cámara situada encima de los laberintos para realizar posteriormente el análisis. La memoria en el reconocimiento de objetos de los ratones se midió como el índice de discriminación (ID), que se calcula como la diferencia entre el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso y el objeto familiar dividido por el tiempo total explorando ambos objetos (Ec. 1). Un ID positivo refleja una exploración del objeto novedoso durante más tiempo que el objeto familiar, el cual se da por la retención de la memoria del objeto familiar en el ratón.

$$ID = \frac{\text{tiempo de exploración objeto novedoso} - \text{tiempo de exploración objeto familiar}}{\text{tiempo total de exploración}} \quad (1)$$

## 2.4 PREPARACIÓN MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A partir de los cerebros fijados de 12 ratones se obtuvieron secciones coronales de 50 µm a la altura de la región CA1 del hipocampo con ayuda de un vibratomo y se recogieron en PBS 0,1M (pH 7,4) a temperatura ambiente. Las secciones se osmificaron (1% OsO4 en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4) durante 20 minutos para darles contraste. Después los cortes se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente hasta el Óxido de Propileno y se embebieron en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina Epon 812 en un agitador durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las secciones se embebieron en resina pura durante 2 horas a temperatura ambiente y a continuación la resina polimerizó a 60°C en una estufa durante 2 días. Con la ayuda de un microscopio óptico se recortaron las regiones CA1 del hipocampo, y éstas se pegaron a cápsulas de resina polimerizada. Finalmente se obtuvieron secciones ultrafinas de 50 nm de grosor de la región CA1 con la ayuda de un ultramicrotomo, que fueron recogidas en rejillas de níquel y

contrastadas con citrato de plomo. Las secciones ultrafinas se examinaron con un microscopio electrónico (JEOL JEM 1400 Plus). Las figuras se crearon con Adobe Photoshop (CS3, Adobe Systems; Versión 10.0)

## 2.5 ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL

En el microscopio electrónico se examinó la ultraestructura de la región CA1 del hipocampo de los ratones tratados con THC (n=3), con SR141716 (n=3), con THC-SR141716 (n=3) y los controles (n=3). Se tomaron micrografías electrónicas de forma aleatoria ( $\times 10.000$ ;  $10,94 \mu\text{m}^2$  cada una, 80 micrografías por ratón). El área total analizada de la región CA1 del hipocampo por ratón fue de  $875 \mu\text{m}^2$ . El número y áreas ocupadas por cada compartimento (dendritas, espinas dendríticas, terminales sinápticos y mitocondrias) fue analizado con el programa FIJI/ImageJ.

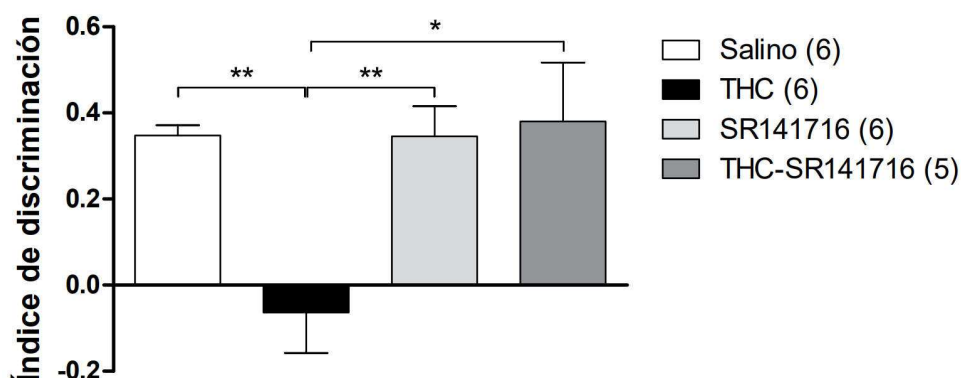
## 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores en las figuras se representan como las medias  $\pm$  SEM, obtenidos mediante el software GraphPad Prism 5. Se aplicó siempre un test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) antes de realizar los tests estadísticos. Se analizó una potencial variabilidad entre los ratones de un mismo grupo experimental (n=3), aplicando el test no paramétrico Kruskal–Wallis o el test paramétrico One-way ANOVA. Por último, los datos fueron analizados por medio de tests paramétricos y no paramétricos (Mann–Whitney U test o unpaired t test).

## 3. RESULTADOS

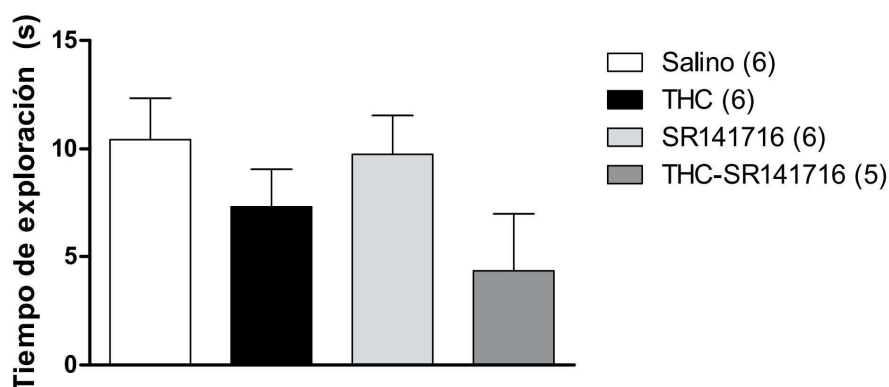
### 3.1 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

Se examinó el impacto de la exposición aguda del THC y el efecto de la co-administración de THC más Rimonabant (SR141716) a las 24 horas sobre la memoria de reconocimiento de objetos en ratones mediante las pruebas NORT (Fig. 2). El índice de discriminación (ID) se calculó en la fase T2 de la prueba en base a la diferencia entre los tiempos de exploración del objeto novedoso y el objeto familiar (Ec. 1).



**Figura 2. Efecto a corto plazo de los tratamientos THC y Rimonabant sobre la memoria de reconocimiento de objetos en la prueba NORT.** Los tratamientos se administraron al terminar la fase T1, el Rimonabant 20 minutos antes que el THC en la co-administración, y los índices de discriminación se obtuvieron 24h después, en la fase T2 (n = 5-6 animales por grupo, se especifica entre paréntesis en la leyenda). Los datos representados en los gráficos se expresan como media  $\pm$  SEM (Prueba t de Student \*p < .05; \*\*p < .01; \*\*\*p < .001).

La administración aguda de THC (5 mg/kg) tras la fase T1 en la prueba de reconocimiento de objetos produjo una disminución significativa en el índice de discriminación respecto a los ratones salinos (\*\* $p < .01$ ; Fig. 2). Como se había anticipado, la exposición al THC perjudicó la consolidación de la memoria en ratones, impidiendo la discriminación entre el objeto novedoso y el previamente explorado en la fase T1 del NORT. Sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas en el tiempo de exploración total de la fase T2 entre los ratones tratados con THC y los salinos ( $p > .05$ ; Fig. 3). En base a esta información, se deduce que las diferencias descritas en la figura 2 no se deben a alteraciones en el comportamiento de exploración o en la actividad locomotora. El papel de los receptores CB1 en el impacto del THC sobre la memoria se confirmó mediante la administración previa de Rimonabant, un antagonista específico del receptor CB1. La disminución sobre el índice de discriminación causada por el THC se vio significativamente revertida en la co-administración de THC-SR141716 (\* $p < .05$ ; Fig. 2), que tampoco afectó significativamente a los tiempos de exploración de la fase T2 ( $p > .05$ ; Fig. 3). El Rimonabant suministrado 20 minutos antes de la inyección de THC, estaría ejerciendo su efecto antagonista sobre los receptores CB1, impidiendo así la interacción THC-CB1 que provoca el detrimento de la memoria en los ratones. También se observó que la exposición única al SR141716 no produjo efectos significativos sobre la memoria ( $p > .05$ ; Fig. 2) ni sobre los tiempos de exploración ( $p > .05$ ; Fig. 3) respecto al grupo salino.

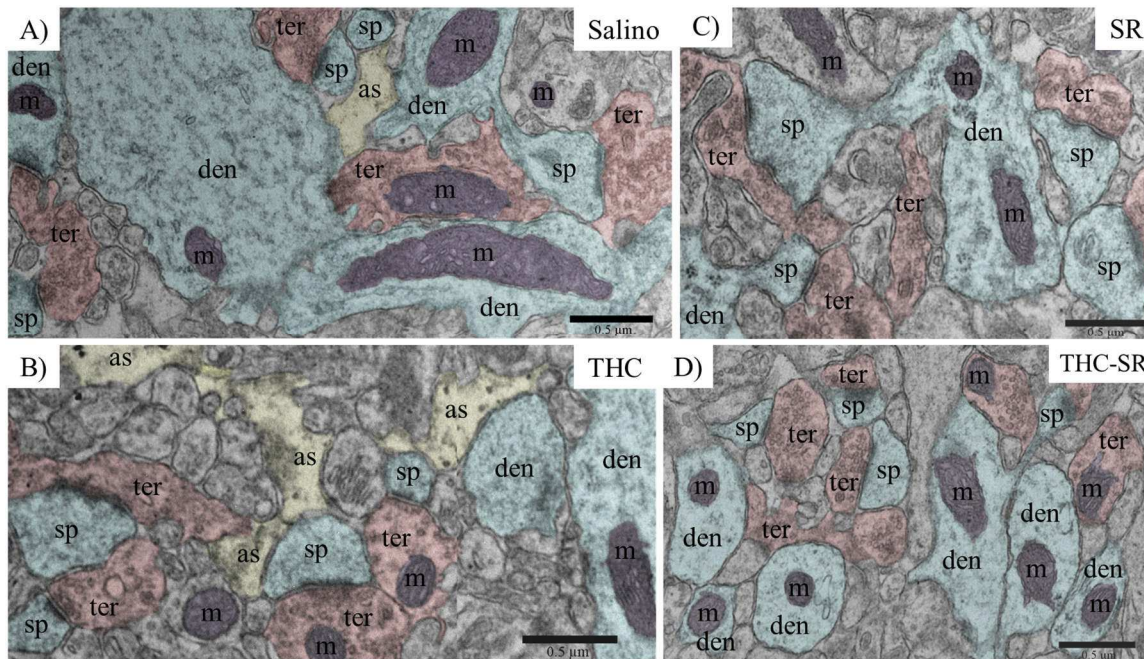


**Figura 3. Efecto a corto plazo de los tratamientos THC y Rimonabant sobre los tiempos totales de exploración en la prueba NORT.** Los tratamientos se administraron al terminar la fase T1, el Rimonabant 20 minutos antes que el THC en la coadministración, y los tiempos de exploración se obtuvieron 24h después en la fase T2 ( $n = 5-6$  animales por grupo, se especifica entre paréntesis en la leyenda). Los datos representados en los gráficos se expresan como media  $\pm$  SEM (Prueba U de Mann-Whitney \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ).

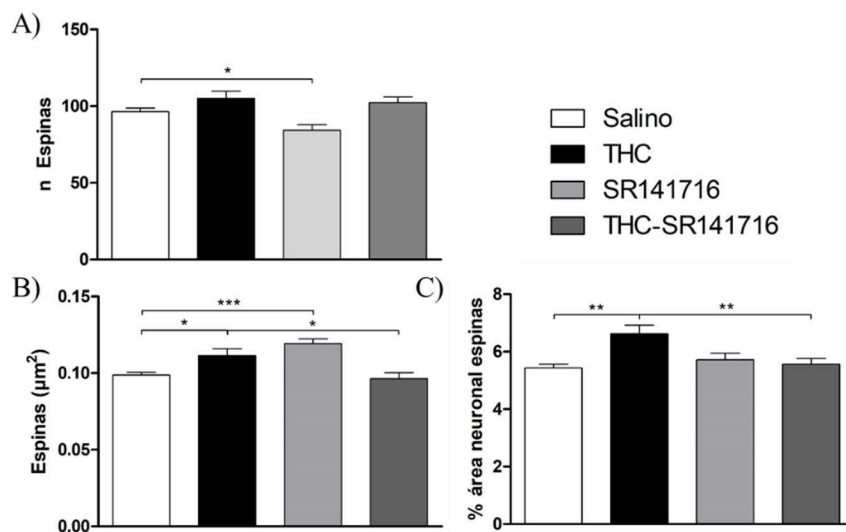
Estos datos indican un claro efecto perjudicial de la administración aguda del THC sobre la memoria en el reconocimiento de objetos, mediado por la interacción entre THC y el receptor CB1. Motivo por el cual el efecto se ve revertido por una exposición previa al antagonista del receptor CB1, el Rimonabant.

### 3.2 ANÁLISIS DE ULTRAESTRUCTURA

Se analizó el efecto a las 24 horas de la exposición al THC sobre la ultraestructura de la región CA1 del hipocampo en 12 ratones, y se comprobó su dependencia al receptor CB1 por la exposición al Rimonabant (Fig. 4, 5, 6, 7,8 y 9).



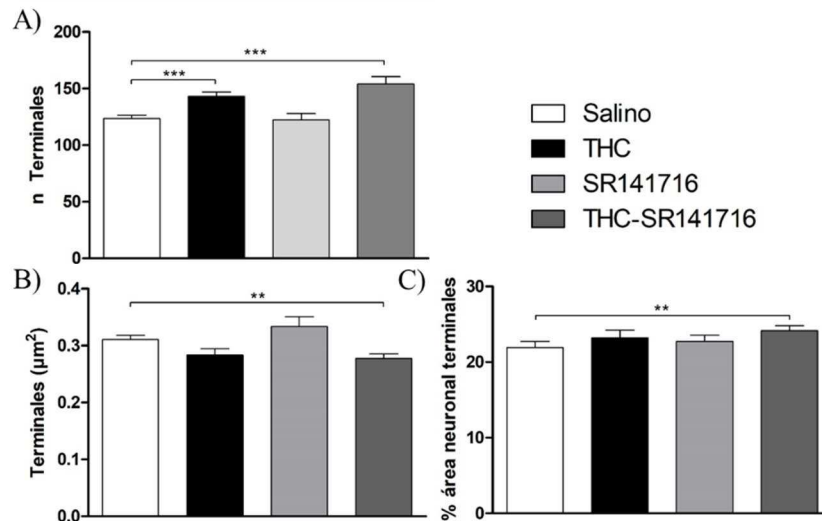
**Figura 4. Ultraestructura del CA1 stratum radiatum del hipocampo en los ratones control y tratados con THC y/o Rimonabant.** La ultraestructura está compuesta por dendritas (den, azul), espinas dendríticas (sp, azul), terminales sinápticos (ter, rojo), mitocondrias (m, morado) y astrocitos (as, amarillo). A) Ratones salinos. B) Ratones tratados con THC. C) Ratones tratados con SR141716. D) Ratones co-tratados con THC y SR141716. Barra de Escala = 0.5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5. Cambios ultraestructurales de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo a las 24 horas tras la exposición aguda a THC, SR141716 y la co-administración de THC y SR141716.** A) Número de espinas dendríticas por conjunto de 4x4 micrografías electrónicas (175  $\mu\text{m}^2$ ). B) Proporción del área ocupada por las espinas dendríticas normalizada respecto al área neuronal total. C) Área de las espinas dendríticas. Los datos para cada tratamiento vienen expresados como media  $\pm$  SEM (T test no emparejado o Prueba U de Mann-Whitney \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ).

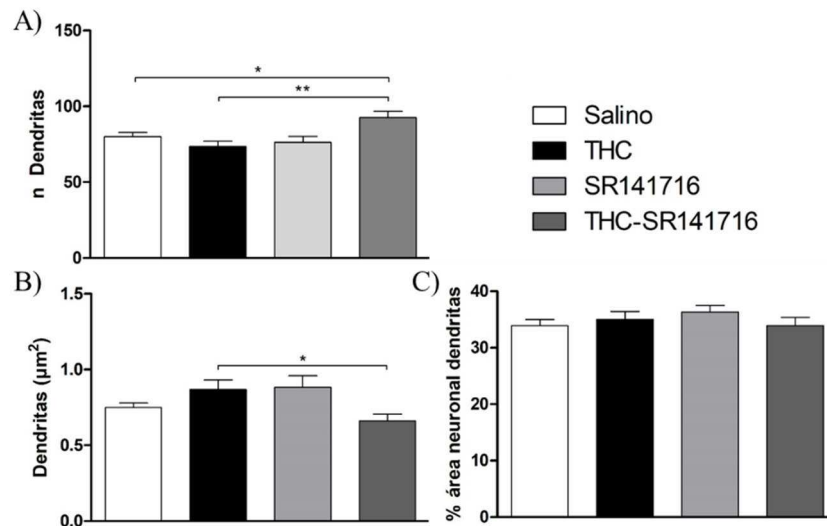
Las regiones CA1 de los ratones expuestos a THC mostraron un aumento significativo en el tamaño de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales (salino:  $0.098 \pm 1.8 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC:  $0.111 \pm 4.4 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; \* $p < .05$ ; Fig. 5), el cual se vio revertido por el efecto antagonista del Rimonabant (THC:  $0.111 \pm 4.4 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC-SR141716:  $0.096 \pm 4 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ;  $p > .05$ ; Fig. 5). Sin embargo, las espinas también aumentaron significativamente en tamaño bajo la exposición única a

Rimonabant (salino:  $0.098 \pm 1.8 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; SR141716:  $0.119 \pm 3.1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; \*\*\* $p < .001$ ; Fig. 5), efecto que podría ser el causante de la reversión previamente mencionada. Además, el número de espinas en la región CA1 disminuyó bajo este mismo tratamiento (salino:  $96.33 \pm 2.40$  espinas; SR141716:  $84.33 \pm 3.63$  espinas; \* $p < .05$ ; Fig. 5). El porcentaje total del área neuronal ocupado por las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de los ratones salinos fue de  $5.43 \pm 0.13\%$ , el cual aumentó en los tratados con THC,  $6.62 \pm 0.29\%$  (\*\* $p < .01$ ; Fig. 5), y se vio revertido a los valores control bajo el co-tratamiento de THC-SR141716,  $5.57 \pm 0.19\%$  (\*\* $p < .01$ ; Fig. 5).



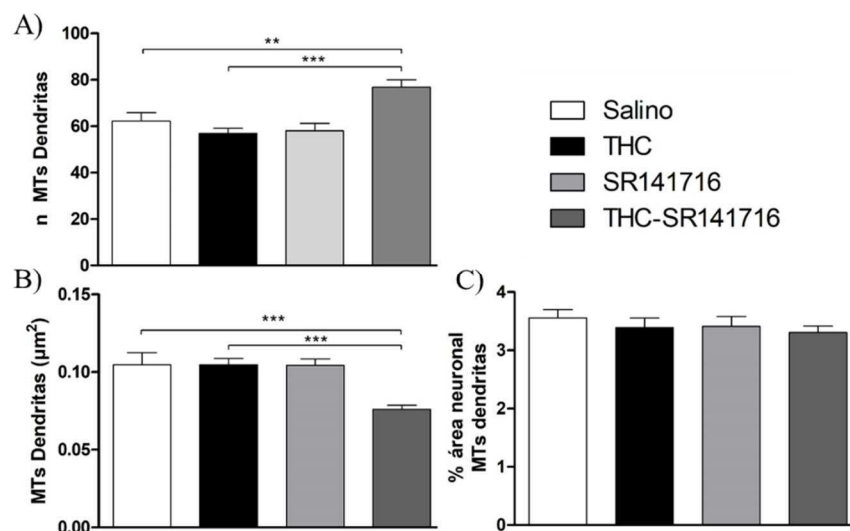
**Figura 6. Cambios ultraestructurales de los terminales sinápticos en la región CA1 del hipocampo a las 24 horas tras la exposición aguda a THC, SR141716 y la co-administración de THC y SR141716.** A) Número de terminales sinápticos por conjunto de 4x4 micrografías electrónicas ( $175 \mu\text{m}^2$ ). B) Proporción del área ocupada por los terminales sinápticos normalizada respecto al área neuronal total. C) Área de los terminales sinápticos. Los datos para cada tratamiento vienen expresados como media  $\pm$  SEM (T test no emparejado o Prueba U de Mann-Whitney \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ).

Se observó además en los ratones tratados con THC, un aumento significativo en el número de terminales sinápticos (salino:  $123.3 \pm 3.17$  terminales; THC:  $143.1 \pm 3.77$  terminales; \*\*\* $p < .001$ ; Fig. 6), el cual no se revirtió por la exposición previa al Rimonabant (THC:  $143.1 \pm 3.77$  terminales; THC-SR141716:  $153.9 \pm 6.74$  terminales;  $p > .05$ ; Fig. 6). Sin embargo, el tamaño de los mismos solo se vio significativamente disminuido en los ratones tratados con THC-SR141716 (salino:  $0.31 \pm 7.6 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC-SR141716:  $0.277 \pm 8.2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; \*\* $p < .01$ ; Fig. 6), aunque se apreció una tendencia a la disminución en los valores obtenidos para la exposición al cannabinoide (salino:  $0.31 \pm 7.6 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC:  $0.284 \pm 0.011$ ;  $p > .05$ ; Fig. 6). Estos datos parecen sugerir un efecto independiente al receptor CB1 sobre la ultraestructura de los terminales sinápticos en el CA1 del hipocampo.



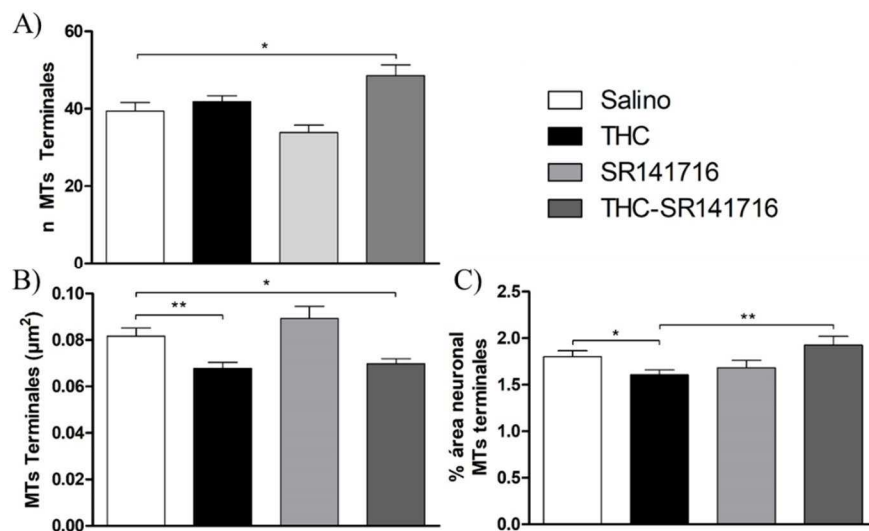
**Figura 7. Cambios ultraestructurales de las dendritas de las neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo a las 24 horas tras la exposición aguda a THC, SR141716 y la co-administración de THC y SR141716.** A) Número de dendritas por conjunto de 4x4 micrografías electrónicas (175 μm<sup>2</sup>). B) Proporción del área ocupada por las dendritas normalizada respecto al área neuronal total. C) Área de las dendritas. Los datos para cada tratamiento vienen expresados como media ± SEM (T test no emparejado o Prueba U de Mann-Whitney \*p < .05; \*\*p < .01; \*\*\*p < .001).

Las dendritas de las neuronas piramidales de los ratones salinos presentaron un perfil del  $33.91 \pm 1.06$  % ocupado respecto al área total neuronal, el cual se mantuvo sin cambios significativos en los ratones tratados con THC ( $35.03 \pm 1.42$  %;  $p > .05$ ; Fig. 7), Rimonabant ( $36.34 \pm 1.14$  %;  $p > .05$ ; Fig. 7), y ambos compuestos ( $33.91 \pm 1.43$  %;  $p > .05$ ; Fig. 7). Aunque si se observó un aumento del número de dendritas en los ratones co-tratados con THC y Rimonabant (salino:  $79.93 \pm 2.71$  dendritas; THC-SR141716:  $92.60 \pm 4.08$  dendritas; \*p < .05; Fig. 7).



**Figura 8. Cambios ultraestructurales de las mitocondrias de las dendritas en la región CA1 del hipocampo a las 24 horas tras la exposición aguda a THC, SR141716 y la co-administración de THC y SR141716.** A) Número de mitocondrias en dendritas por conjunto de 4x4 micrografías electrónicas (175 μm<sup>2</sup>). B) Proporción del área ocupada por las mitocondrias en dendritas normalizada respecto al área neuronal total. C) Área de las mitocondrias en dendritas. Los datos para cada tratamiento vienen expresados como media ± SEM (T test no emparejado o Prueba U de Mann-Whitney \*p < .05; \*\*p < .01; \*\*\*p < .001).

Las mitocondrias de las dendritas no sufrieron ningún cambio en los ratones tratados únicamente con THC (Salino:  $62.20 \pm 3.62$  mitocondrias; THC:  $56.87 \pm 2.28$  mitocondrias; salino:  $0.105 \pm 7.7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC:  $0.105 \pm 4.1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ;  $p > .05$ ; Fig. 8), o con Rimonabant (Salino:  $62.20 \pm 3.62$  mitocondrias; SR141716:  $58.00 \pm 3.24$  mitocondrias; salino:  $0.105 \pm 7.7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; SR141716:  $0.104 \pm 4.2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ;  $p > .05$ ; Fig. 8). Sin embargo, la exposición a ambos tratamientos en conjunto, provocó un aumento en el número de mitocondrias (Salino:  $62.20 \pm 3.62$  mitocondrias; THC-SR141716:  $76.80 \pm 3.28$  mitocondrias;  $**p < .01$ ; Fig. 8) y una disminución en sus respectivas áreas (salino:  $0.105 \pm 7.7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC-SR141716:  $0.076 \pm 2.6 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ;  $***p < .001$ ; Fig. 8). Aunque el aumento en el número de mitocondrias podría estar directamente relacionado al aumento observado en el número de dendritas bajo este mismo tratamiento. En conjunto no se observaron diferencias significativas en el porcentaje total del área neuronal ocupada entre ninguno de los grupos experimentales (salino:  $3.55 \pm 0.15\%$ ; THC:  $3.39 \pm 0.16\%$ ; SR141716:  $3.41 \pm 0.17\%$ ; THC-SR141716:  $3.30 \pm 0.11\%$ ;  $p > .05$ ; Fig. 8).



**Figura 9. Cambios ultraestructurales de las mitocondrias de los terminales sinápticos en la región CA1 del hipocampo a las 24 horas tras la exposición aguda a THC, SR141716 y la co-administración de THC y SR141716.** A) Número de mitocondrias en terminales por conjunto de 4x4 micrografías electrónicas ( $175 \mu\text{m}^2$ ). B) Proporción del área ocupada por las mitocondrias en terminales normalizada respecto al área neuronal total. C) Área de las mitocondrias en terminales. Los datos para cada tratamiento vienen expresados como media  $\pm$  SEM (T test no emparejado o Prueba U de Mann-Whitney  $*p < .05$ ;  $**p < .01$ ;  $***p < .001$ ).

Por el contrario, las mitocondrias de los terminales sinápticos sí que disminuyeron significativamente en tamaño en los ratones tratados con THC (salino:  $0.082 \pm 3.3 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC:  $0.068 \pm 2.7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ;  $**p < .01$ ; Fig. 9), y mantuvieron estas mismas alteraciones pese a la exposición previa al Rimonabant (THC:  $0.068 \pm 2.7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ; THC-SR141716:  $0.070 \pm 2.1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ ;  $p > .05$ ; Fig. 9). En cambio, el número de mitocondrias en los terminales sinápticos aumentó solo bajo el tratamiento conjunto del THC y el Rimonabant (Salino:  $39.40 \pm 2.21$  mitocondrias; THC-SR141716:  $48.60 \pm 2.72$  mitocondrias;  $*p < .05$ ; Fig. 9), motivo por el que el porcentaje total del área neuronal ocupado por los terminales de este grupo experimental (salino:  $1.80 \pm 0.07\%$ ; THC-SR141716:  $1.92 \pm 0.10\%$ ;  $p > .05$ ; Fig. 9) parece revertir los valores obtenidos para el tratamiento con THC (THC:  $1.61 \pm 0.05\%$ ; THC-SR141716:  $1.92 \pm 0.10\%$ ;  $**p < .01$ ; Fig. 9).



## 4. DISCUSIÓN

Los resultados en este estudio demuestran que la exposición aguda al THC *in vivo* genera cambios a nivel ultraestructural que afectan a espinas dendríticas, terminales sinápticos y mitocondrias de la región CA1 del hipocampo, y que perduran al menos 24 horas tras la administración del compuesto psicoactivo. Además estas alteraciones a nivel ultraestructural no parecen depender únicamente del receptor CB1, pues la administración previa de Rimonabant no revierte algunos de los efectos observados, e incluso genera otros efectos no vistos con la exposición única al THC.

Inicialmente se comprobó el efecto del THC sobre la memoria de los ratones en el reconocimiento de objetos. En línea con lo observado en otros estudios, se vio un claro detrimento cognitivo dependiente de la activación del receptor CB1, que se revertía completamente bajo la administración previa del antagonista SR141716 o Rimonabant (Busquets-Garcia *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2012; Puighermanal *et al.*, 2013). Se desconocen los mecanismos exactos que subyacen al deterioro de la memoria mediado por la activación de los receptores CB1 del hipocampo. Sin embargo, se han propuesto diferentes vías necesarias para la aparición de estos efectos, como la activación esencial de los receptores CB1 astrogliales (Han *et al.*, 2012; Robin *et al.*, 2018b), o la desregulación entre la neurotransmisión excitadora e inhibidora por una mayor inhibición CB1 dependiente de los terminales GABAérgicos respecto a los glutamatérgicos del hipocampo (Busquets-Garcia *et al.*, 2015; Puighermanal *et al.*, 2012). Aun así, estudiar el papel exacto de los receptores CB1 es muy difícil, pues su activación en diferentes subpoblaciones celulares produce consecuencias diversas e incluso opuestas en las funciones cerebrales, como es el caso de los receptores CB1 en los terminales glutamatérgicos y GABAérgicos (Busquets-Garcia *et al.*, 2015; Monory *et al.*, 2015).

Múltiples estudios describen alteraciones a nivel estructural en el hipocampo y otras regiones cerebrales dependientes del receptor CB1 (Buceta *et al.*, 2019; Monory *et al.*, 2015) o por la exposición al THC (Bonilla-Del Río *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2013). Sin embargo, actualmente se desconoce si estas alteraciones a nivel estructural en el cerebro subyacen a los efectos del THC sobre los déficits funcionales en la plasticidad sináptica, y en el comportamiento y la cognición. En este estudio, el análisis morfométrico realizado sobre los cambios ultraestructurales en la región CA1 del hipocampo, mostró un aumento en el tamaño de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales bajo la exposición al THC, el cual se revirtió por la exposición previa a Rimonabant. Sin embargo, este aumento en el tamaño de las espinas dendríticas también se dio bajo la exposición individual al Rimonabant. Además, el número de terminales sinápticos aumentó, tanto bajo la inyección de THC como de TCH-Rimonabant, mientras que sus tamaños se vieron disminuidos únicamente por la co-administración de ambos compuestos. El número de mitocondrias permaneció invariable bajo los efectos del THC, aunque se observó una disminución en los tamaños de las mitocondrias de los terminales sinápticos. No obstante, la exposición en conjunto al THC y al Rimonabant, generó un aumento en los perfiles mitocondriales y una disminución en su tamaño tanto en las dendritas como en los terminales sinápticos.

En el hipocampo, los receptores CB1 se expresan mucho más en los terminales sinápticos GABAérgicos que en los Glutamatérgicos, y, además, los terminales inhibidores presentan una mayor sensibilidad al THC (Kawamura *et al.*, 2006; Laaris *et al.*, 2010). Asimismo, se ha descrito

que la depresión a largo plazo (LTD) de los terminales inhibidores inducida por cannabinoides, es capaz de promover la potenciación a largo plazo (LTP) de los terminales excitadores (Puighermanal *et al.*, 2012). Así, la administración de THC en ratones produce un descenso en los niveles de GABA y un aumento en la liberación de glutamato, que se ha asociado al déficit en los procesos de la memoria producidos por la exposición a cannabinoides (Busquets-García *et al.*, 2015). También se ha expuesto la dinámica estructural de las espinas dendríticas como contribuidora a mantener los procesos de plasticidad funcional, pues se sabe que bajo procesos de LTP las espinas son alteradas y aparecen con un mayor tamaño, pudiendo contribuir así a la potenciación sináptica a largo plazo (Bourne y Harris, 2008; Kasai *et al.*, 2010). Teniendo estos datos en cuenta, el aumento visto en el tamaño de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales por la exposición a THC, podría deberse a una LTP excitatoria inducida por la disminución CB1-dependiente de la liberación de GABA en los terminales inhibidores del hipocampo. La dependencia al CB1 se confirmó por la exposición previa a Rimonabant, cuyo efecto antagonista sobre el receptor CB1 impediría la LTD inducida por el THC sobre los terminales GABAérgicos del hipocampo, obstruyendo en último lugar la alteración estructural de las espinas dendríticas que contribuye a la LTP excitatoria.

Los terminales sinápticos de la región CA1 del hipocampo aumentaron en número tras la exposición a las 24 horas al THC. Estos resultados no coinciden con lo descrito en la bibliografía para la exposición aguda al THC, donde no se observaron diferencias significativas en los terminales sinápticos respecto a los controles (Bonilla-Del Río *et al.*, 2021). Además, este efecto sobre la ultraestructura no parece ser dependiente al receptor CB1, pues se mantiene en la co-administración de THC y Rimonabant, la cual también genera un aumento en el tamaño de los terminales sinápticos del CA1 stratum radiatum. Se ha descrito que el THC actúa como agonista de los receptores CB1, CB2 y el receptor acoplado a proteínas G 55(GPR55) (Pertwee *et al.*, 2010), por lo que los efectos observados sobre la ultraestructura de los terminales sinápticos podrían deberse a la interacción del THC con otro de los receptores para los que el Rimonabant no actúa como antagonista.

No ha sido hasta hace relativamente poco que se ha descrito la importancia de los receptores CB1 mitocondriales en los efectos de los cannabinoides sobre la memoria por medio de procesos bioenergéticos (Bénard *et al.*, 2012; Hebert-Chatelain *et al.*, 2014). Actualmente se sabe que la activación de los receptores CB1 mitocondriales en el hipocampo induce una reducción en los niveles de cAMP y en la fosforilación dependiente de la proteína quinasa A (PKA) de subunidades específicas del sistema de transporte electrónico mitocondrial. Estos eventos conducen a una disminución de la actividad mitocondrial, necesaria para los efectos de los cannabinoides sobre la movilidad mitocondrial, la depresión sináptica y la amnesia (Hebert-Chatelain *et al.*, 2016). Los resultados en este estudio muestran un aumento en el número de mitocondrias pero de tamaño reducido bajo el co-tratamiento de THC y Rimonabant, el cual es muy similar al observado en otro estudio bajo la exposición aguda al THC (Bonilla-Del Río *et al.*, 2021). Sin embargo, bajo la exposición al THC solo disminuyen en tamaño las mitocondrias de los terminales sinápticos. Estos resultados indican una alteración en la dinámica mitocondrial, esencial para las funciones mitocondriales, que es alterada por la acción antagonista del Rimonabant, pero no revertida por el mismo. No obstante, se ha visto que la exclusión genética de los receptores CB1 de las

mitocondrias hipocampales previene la reducción dependiente de cannabinoides de la movilidad mitocondrial (Hebert-Chatelain *et al.*, 2016). Por lo que otros mecanismos no dependientes al receptor CB1 de las mitocondrias podrían estar afectando a dicha movilidad.

En conclusión, la exposición aguda al THC genera cambios a nivel ultraestructural en la región CA1 del hipocampo, tanto de manera dependiente como independiente al receptor CB1, que podrían contribuir en los efectos de los cannabinoides sobre la plasticidad sináptica, el comportamiento y la memoria.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Bahr, B., Karanian, D., Mankanji, S., & Makriyannis, A. (2006). Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 15(4), 351-365.

Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Mimenza, A., Ramos, A., Serrano, M., & Lekunberri, L. et al. (2021). Acute  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol prompts rapid changes in cannabinoid CB 1 receptor immunolabeling and subcellular structure in CA1 hippocampus of young adult male mice. *Journal of Comparative Neurology*, 1–15.

Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mulle, C., Ortega-Gutiérrez, S., Martín-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaouloff, F., Marsicano, G. (2012). Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience*, 15(4), 558–564.

Bourne, J. N. y Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 47–67.

Broyd, S., van Hell, H., Beale, C., Yücel, M., & Solowij, N. (2016). Acute and chronic effects of cannabinoids on human cognition—A systematic review. *Biological Psychiatry*, 79(7), 557-567.

Brown, S., Brenowitz, S., & Regehr, W. (2003). Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nature Neuroscience*, 6(10), 1048-1057.

Buceta, I., Elezgarai, I., Rico-Barrio, I., Gerrikagoitia, I., Puente, N. y Grandes, P. (2019). Deletion of the cannabinoid CB 1 receptor impacts on the ultrastructure of the cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Journal of Comparative Neurology*, 528(6), 1041–1052.

Busquets-García, A., Desprez, T., Metna-Laurent, M., Bellocchio, L., Marsicano, G. y Soria-Gomez, E. (2015). Dissecting the cannabinergic control of behavior: The where matters. *BioEssays*, 37(11), 1215–1225.

Busquets-García, A., Gomis-González, M., Salgado-Mendialdúa, V., Galera-López, L., Puighermanal, E., & Martín-García, E. et al. (2018). Hippocampal Protein Kinase C signaling mediates the short-term memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 1021-1031.

- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., & Soria-Gómez, E. et al. (2012). Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience*, 15(4), 558-564.
- Calabrese, E., & Rubio-Casillas, A. (2018). Biphasic effects of THC in memory and cognition. *European Journal Of Clinical Investigation*, 48(5), e12920.
- Campbell, V., & Gowran, A. (2007). Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids?. *British Journal Of Pharmacology*, 152(5), 655-662.
- Centonze, D., Finazzi-Agrò, A., Bernardi, G., & Maccarrone, M. (2007). The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends In Pharmacological Sciences*, 28(4), 180-187.
- Chen, R., Zhang, J., Fan, N., Teng, Z., Wu, Y., & Yang, H. et al. (2013).  $\Delta^9$ -THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. *Cell*, 155(5), 1154-1165.
- Chen, X., Zhang, J., & Chen, C. (2011). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against  $\beta$ -amyloid insults. *Neuroscience*, 178, 159-168.
- Chevaleyre, V., Heifets, B. D., Kaeser, P. S., Südhof, T. C. y Castillo, P. E. (2007). Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and RIM1 $\alpha$ . *Neuron*, 54(5), 801–812.
- Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2019). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 9-29.
- Derkinderen, P., Toutant, M., Burgaya, F., Le Bert, M., Siciliano, J., & de Franciscis, V. et al. (1996). Regulation Of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science*, 273(5282), 1719-1722.
- Fan, N., Yang, H., Zhang, J., & Chen, C. (2010). Reduced expression of glutamate receptors and phosphorylation of CREB are responsible for in vivo  $\Delta^9$ -THC exposure-impaired hippocampal synaptic plasticity. *Journal Of Neurochemistry*, 112(3), 691-702.
- Fraguas-Sánchez, A., & Torres-Suárez, A. (2018). Medical use of cannabinoids. *Drugs*, 78(16), 1665-1703.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., & Georges, F. et al. (2012). Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148(5), 1039-1050.
- Hebert-Chatelain, E., Reguero, L., Puente, N., Lutz, B., Chaouloff, F., Rossignol, R., Piazza, P.-V., Benard, G., Grandes, P. y Marsicano, G. (2014). Cannabinoid control of brain bioenergetics: Exploring the subcellular localization of the CB1 receptor. *Molecular Metabolism*, 3(4), 495–504.
- Herkenham, M., Lynn, A., Johnson, M., Melvin, L., de Costa, B., & Rice, K. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal Of Neuroscience*, 11(2), 563-583.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. y Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129.

- Kuniishi, H., Ichisaka, S., Yamamoto, M., Ikubo, N., Matsuda, S., & Futora, E. et al. (2017). Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. *Neuroscience Research*, 123, 27-35.
- Hoffman, A., Oz, M., Yang, R., Lichtman, A., & Lupica, C. (2007). Opposing actions of chronic  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. *Learning & Memory*, 14(1-2), 63-74.
- Kathmann, M., Weber, B., & Schlicker, E. (2001). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*, 363(1), 50-56.
- Kraeuter, A., Guest, P., & Sarnyai, Z. (2018). The Open Field Test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Methods In Molecular Biology*, 99-103.
- Kawamura, Y. (2006). The CB1 Cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *Journal Of Neuroscience*, 26(11), 2991-3001.
- Laaris, N., Good, C., & Lupica, C. (2010).  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol is a full agonist at CB1 receptors on GABA neuron axon terminals in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 59(1-2), 121-127.
- Lichtman, A., Dimen, K., & Martin, B. (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 119(3), 282-290.
- Lueptow, L. (2017). Novel Object Recognition Test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal Of Visualized Experiments*, (126).
- Marconi, A., Di Forti, M., Lewis, C., Murray, R., & Vassos, E. (2016). Meta-analysis of the association between the level of cannabis use and risk of psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, 42(5), 1262-1269.
- Marinelli, S., Pacioni, S., Bisogno, T., Di Marzo, V., Prince, D., Huguenard, J., & Bacci, A. (2008). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical interneurons. *Journal Of Neuroscience*, 28(50), 13532-13541.
- Maurya, N., & Velmurugan, B. (2018). Therapeutic applications of cannabinoids. *Chemico-Biological Interactions*, 293, 77-88.
- Meruelo, A., Castro, N., Cota, C., & Tapert, S. (2017). Cannabis and alcohol use, and the developing brain. *Behavioural Brain Research*, 325, 44-50.
- Monory, K., Polack, M., Remus, A., Lutz, B. y Korte, M. (2015). Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(9), 3842–3850.
- Neves, G., Cooke, S. & Bliss, T. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65–75 (2008).
- Pickel, V. M., Bourie, F., Chan, J., Mackie, K., Lane, D. A. y Wang, G. (2019). Chronic adolescent exposure to  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol decreases NMDA current and extrasynaptic plasmalemmal

density of NMDA GluN1 subunits in the prelimbic cortex of adult male mice. *Neuropsychopharmacology*, 45(2), 374–383.

Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Gomis-González, M., Marsicano, G., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2013). Dissociation of the pharmacological effects of THC by mTOR blockade. *Neuropsychopharmacology*, 38(7), 1334-1343.

Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2012). Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1607), 3254-3263.

Robin, L. M., Oliveira da Cruz, J. F., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Papouin, T., Varilh, M., Sherwood, M. W., Belluomo, I., Balcells, G., Matias, I., Bosier, B., Drago, F., Van Eeckhaut, A., Smolders, I., Georges, F., ... Marsicano, G. (2018b). Astroglial CB1 Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory. *Neuron*, 98(5), 935–944.e5.

United Nations Office on Drugs and Crime WDR (2020): United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2020.

Vallersnes, O., Dines, A., Wood, D., Yates, C., Heyerdahl, F., & Hovda, K. et al. (2016). Psychosis associated with acute recreational drug toxicity: a European case series. *BMC Psychiatry*, 16(1).

Varvel, S., Hamm, R., Martin, B., & Lichtman, A. (2001). Differential effects of  $\Delta^9$ -THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology*, 157(2), 142-150.

Wilson RC, Vacek T, Lanier DL, Dewsbury DA. (1976). Open-Field behaviour in muroid rodents. *Behav Biol*, 17:495-506

Wise, L., Thorpe, A., & Lichtman, A. (2009). Hippocampal CB1 receptors mediate the memory impairing effects of  $\delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*, 34(9), 2072-2080.

Wu, D. F., Yang, L. Q., Goschke, A., Stumm, R., Brandenburg, L. O., Liang, Y. J., Höllt, V., & Koch, T. (2008). Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *Journal of Neurochemistry*, 104(4), 1132–1143.