

TREBALLEM L'ESTRUCTURA D'UN ARTICLE CIENTÍFIC A L'AULA

DOCUMENT DE TREBALL PER A L'ALUMNAT

Efectes psiconeuroendocrins i depenents del sexe del consum de cànnabis i èxtasi en un model animal adolescent

Alvaro Llorente-Berzal^{1,2}, Emma Puighermanal³, Aurelijus Burokas³, Andrés Ozaita³, Rafael Maldonado^{3*}, Ev M. Marco^{1,2}, Maria-Paz Viveros^{1,2*}

1 Departamento de Fisiología (Fisiología animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 2 Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, 3 Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de Salut, Universitat Pompeu Dabra, Barcelona, Spain

Abstract

L'èxtasi és una droga que acostumen a consumir els joves durant el cap de setmana i freqüentment en combinació amb el cànnabis. En aquest estudi hem investigat els efectes a llarg termini de l'administració de dosis creixents de cànnabis [THC: 2.5, 5, 10 mg/kg] des del dia postnatal 28 al 45, sol o en combinació amb èxtasi [MDMA: dues dosis al dia de 10 mg/kg durant 5 dies] des del dia 30 al 45 en rates mascles i femelles. Quan es van realitzar els tests, després de finalitzar el tractament farmacològic (dia 46), es va observar que les dues drogues havien augmentat l'ansietat d'aquest model animal (reducció en l'exploració directa del test *hole-board*) i que produïen un augment de les conductes de risc i la impulsivitat (augment de l'exploració dels braços oberts en el test *elevated plus maze*). A llarg termini, es va observar que el THC afectava la memòria de les femelles sense afectar la dels mascles, suggerint una major vulnerabilitat d'aquest sexe als efectes del cànnabis (test *novel object*). El THC va disminuir l'expressió d'una proteïna associada al citoesquelet (Arc) i del mRNA d'orexina, una hormona que està relacionada amb la regulació de la ingesta i l'estat de vigília; el MDMA va induir una reducció de l'activitat de dos enzims (ERK1/2) i va prevenir la disminució dels nivells de mRNA d'orexina. A més, aquestes alteracions van presentar diferències entre sexes. Els resultats presentats indiquen que l'exposició adolescent al cànnabis i/o a l'èxtasi induïx alteracions psicofisiològiques a llarg termini depenent del sexe i que existeixen interaccions funcionals entre les dues drogues.

Citation: Llorente-Berzal A, Puighermanal E, Burokas A, Ozaita A, Maldonado R, et al. (2013) Sex-Dependent Psychoneuroendocrine Effects of THC and MDMA in an Animal Model of Adolescent Drug Consumption. PLoS ONE 8(11): e78386. doi:10.1371/journal.pone.0078386

Editor: Yael Abreu-Villaça, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

Received: July 2, 2013; **Accepted:** September 18, 2013; **Published:** November 4, 2013

Copyright: 2013 Llorente-Berzal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud (ISCIII y FEDER): Red de trastornos adictivos RD06/0001/1013, RD2012/0028/0021 and RD06/001/001; GRUPOS UCM-BSCH (GRUPO UCM 951579); Plan Nacional sobre Drogas en la convocatoria de Orden SAS/1250/2009. ALB has a FPU predoctoral grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rafael.maldonado@upf.edu (RM); pazviver@bio.ucm.es (MPV)

Introducció

El MDMA (3,4-metilendioximetanfetamina) és una droga psicoestimulant coneguda popularment com a èxtasi. Aquesta droga indueix un augment del neurotransmissor serotonina i afecta altres neurotransmissors com la dopamina i la noradrenalina [1,2]. També produeix un augment de l'activitat metabòlica, de la producció de radicals lliures i de l'estrès oxidatiu [3]. Els efectes aguts del MDMA duren entre 3 i 5 hores en humans, i entre ells trobem l'eufòria, la relaxació, l'increment de la sociabilitat, l'empatia i l'energia [4,5] i alteracions fisiològiques com la desregulació de la temperatura corporal i la pèrdua de pes [6,7]. A llarg termini, l'ús elevat de MDMA pot conduir a problemes cognitius i d'estat d'ànim com impulsivitat, dèficits de memòria, ansietat i depressió [3,8,9]. L'èxtasi és una droga d'ús recreatiu consumida comunament per adolescents i adults joves [10] en festes i discoteques [3], i la majoria de consumidors també ho són d'altres drogues d'abús com el cànnabis [11,12].

El cànnabis és la droga il·legal més consumida pels adolescents i els adults joves i el seu principal component psicoactiu és el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) [13,14]. El THC exerceix els seus efectes psicoactius a través de l'activació del receptor CB1 cannabinoide, que es troba principalment localitzat al sistema nerviós central. Els receptors de CB1 prenen importància sobretot durant l'adolescència [15], quan es produeixen canvis dels sistemes de neurotransmissió. De fet, l'activació crònica dels receptors CB1 **-pel consum de cànnabis-** durant l'adolescència s'ha associat a deficiències cognitives i alteracions emocionals durant l'etapa adulta, símptomes que s'han trobat en humans i en models animals [16-20]. Per tant, el consum de cànnabis durant aquest període podria causar efectes profunds en la maduració i el funcionament normal del cervell que es notarien en etapes posteriors de la vida [13,14].

L'abús de múltiples drogues en gent jove és un fenomen freqüent que ha augmentat aquests darrers anys. En particular, el cànnabis és la droga il·legal més extensa que també consumeixen els consumidors de MDMA [21,22]. En un estudi realitzat de poc amb estudiants universitaris de la costa est dels Estats Units, el 98% dels consumidors d'èxtasi també havien

consumit cànnabis [23]. La motivació pel policonsum de drogues podria estar influenciada pel fet que el cànnabis s'hagi relacionat amb l'alleujament dels símptomes que apareixen en el període d'abstinència de l'èxtasi com l'ansietat, l'agitació, l'insomni i la depressió. En resum, la combinació freqüent de THC i MDMA en gent jove és preocupant i s'ha d'estudiar més l'impacte de la seva combinació.

Estudis previs s'han centrat en els efectes de l'administració aguda de THC i MDMA en rosegadors adults [24-26]. Malgrat això, la recerca que s'ha fet de la combinació d'ambdues drogues amb exposició crònica és escassa i, al nostre coneixement, l'únic estudi publicat de l'exposició crònica al MDMA i al THC durant l'adolescència només s'ha fet amb ratolins mascle [27]. Les diferències entre sexe afecten múltiples aspectes de l'addicció [28-31] i, en efecte, els estudis clínics han mostrat que les femelles són més susceptibles que els mascles als efectes de les drogues d'abús [31]. Anteriorment, hem estudiat extensament les diferències sexuals després del tractament crònic amb cànnabis durant l'adolescència [15-17,20,28], però només alguns estudis s'han centrat en les diferències en resposta al MDMA [7,32,33], i aquests no ho han fet en animals adolescents.

Seguint en la línia dels nostres resultats anteriors, hem dissenyat un protocol experimental on les rates adolescents d'ambdós sexes han sigut tractades crònicament amb dosis creixents de THC [34] i/o MDMA seguint un consum d'horaris de cap de setmana [35]. El primer i l'últim dia de l'administració del MDMA es va avaluar la temperatura del cos i un dia després del tractament farmacològic, els animals es van testar en el test *holeboard*, que mesura l'activitat motora i l'exploració, i en el test *elevated plus maze*, que avalua la resposta a l'ansietat [36]. Ja com a adults, els animals van ser testats en el *test novel object recognition* per avaluar l'atenció [38]. Per tal de relacionar les respostes comportamentals amb canvis específics de la senyalització intracel·lular, vam mesurar l'expressió de dos enzims (kinases extracel·lulars, ERK1/2) i l'activitat d'una proteïna associada al citoesquelet (Arc). Es creu que en el cervell ERK1/2 estan modulats per l'administració crònica de THC [39] i MDMA [40], i aquestes modificacions s'han relacionat amb canvis de l'estat d'ànim i de l'ansietat [41]. De forma similar,

l'expressió del gen d'Arc es modifica per l'administració aguda de MDMA, i es tradueix en una proteïna relacionada amb la plasticitat sinàptica i l'aprenentatge [42]. A més a més, durant tot l'estudi es va registrar el pes corporal i els nivells circulants de leptina i corticoesterona, dues hormones que responen al cànnabis [15,43] i al MDMA [44,45]. Finalment, es va analitzar l'expressió del mRNA de la prepro-orexina en l'hipotàlem, ja que la seva expressió està regulada per l'alimentació [46] i aquestes dues drogues modifiquen la ingesta.

Materials i mètodes

Tots els experiments s'han aprovat pel *Comité d'Experimentación Animal (CEA)* de la Universidad Complutense, i s'han dissenyat i han estat realitzats d'acord al Reial Decret 1201/2005, octubre 21, 2005 (BOE nº 252) pel que fa a la protecció de l'experimentació animal i la Directiva del Consell de les Comunitats Europees del 24 de novembre de 1986 (86/609/EEC).

Animals

En aquest estudi s'han fet servir rates albines *Wistar* descendents de rates comprades dels Laboratoris Harlan (Mila, Italy). En total s'han fet servir 128 mascles i femelles de 16 ventrades. Tots els animals s'han mantingut en condicions constants de temperatura (22 ± 2 °C) i humitat (50 \pm 2%) en un cicle invers de 12 h de foscor/llum (llum a les 20.00) amb lliure accés de menjar (dieta comercial per rosegadors A04/A03; Safe, Augy, França) i aigua.

Tractament amb les drogues

El delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) s'ha comprat de THC Pharm GmbH (Frankfurt, Alemanya) i s'ha diluït en etanol, cremophor (Sigma-Aldrich, Espanya) i solució salina (1:1:18) tal com s'ha descrit anteriorment [15,47]. El 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) s'ha comprat de Lipomed (Arlesheim, Suïssa) i les seves solucions s'han preparat dia a dia amb salí (0,9% NaCl).

El tractament amb les drogues s'ha administrat només durant l'adolescència, des del dia 28 al 45 [48]. Durant aquest període les rates van rebre injeccions de dosis creixents de THC (2,5 mg/kg des del dia 28 al 34; 5mg/kg del dia 35 al 40; 10mg /kg del 41 al 45) o soles d'acord amb un altre protocol lleugerament modificat [34]. A més a més, cada cinc dies, des del dia 30, els

animals van rebre dues injeccions diàries de MDMA (10mg/kg) o solució salina, amb un interval de 4 hs (aproximadament a les 10.00 i a les 14.00). Aquest protocol segueix el proposat per Meyer et al. (2008) on els autors van mostrar similituds entre el model i els efectes del consum d'èxtasi durant els caps de setmana [35]. Les dues drogues es van administrar a un volum de 2ml/kg (veure Fig. 1 per detalls).

Control del pes corporal

El pes corporal (BW) es va registrar cada dia durant el període d'administració, des del dia 28 al 45 (adolescència), i cada cinc dies des del dia 50 al 70 (adults joves). L'evolució del pes es va calcular com la diferència del BW en relació al valor obtingut del dia 30 (valor de referència).

Mesura de la temperatura corporal

La temperatura corporal es va mesurar amb un aparell termoelèctric rectal, RTM-1 (Cibertec S.A., Madrid, Espanya) durant 10 s. La temperatura corporal es va mesurar el primer (30) i últim dia (45) de l'administració de MDMA o injecció salina, abans de la primera injecció i una i dues hores després. Després de la segona injecció, quatre hores més tard, es va tornar a registrar.

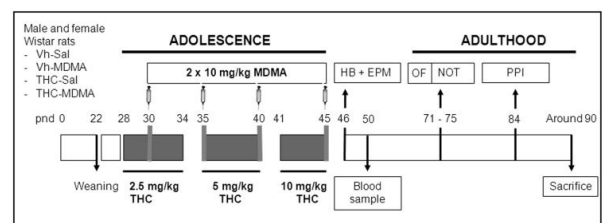


Fig 1. Pla de treball del disseny experimental

Els animals s'exposen a dosis creixents de THC (2,5, 5 i 10 mg/kg o vehicle) des del dia 28 al 45, i dues injeccions de MDMA (10 mg/kg o solució salina) cada 5 dies des del dia 30 al 45, amb un interval de 4h. Un dia després de l'administració de drogues (46) es realitza el test *holeboard* (HB) i l'*elevated plus-maze* (EPM). El *novel object test* (NOT) es realitza el dia 75, i l'*open-field* (OF) des del dia 71 en què hi ha l'habitació. EL dia 84 es realitza l'últim test, el *prepulse inhibition test* (PPI). Al voltant del dia 90 (89-92) els animals es sacrifiquen i s'obté el cervell per a futures anàlisis. A més, s'agafen mostres de sang per realitzar mesures endocrines el dia 50 i el dia del sacrifici.

Tests de comportament

Holeboard. El dia 46 es va posar als animals en l'habitació del test per habitar-los durant 30 min. El *holeboard* consisteix en un escenari quadrat amb les parets metàl·liques, i un terra dividit en 36 quadrats iguals i orificis. En el test, es va col·locar als animals en l'àrea perifèrica durant 5

minuts i es va registrar el seu comportament en vídeo per avaluar-ho posteriorment. Es va registrar el nombre de vegades (freqüència) que l'animal va posar-se dempeus sobre les potes del darrere, la freqüència i durada de l'exploració a inclinar el cap, l'activitat locomotora a cada regió de l'escenari i el percentatge de la deambulació interna, que es va calcular com un índex de l'emocionalitat/ansietat. La caiguda accidental de tres animals a través d'un dels forats va fer que quedessin exclosos de l'anàlisi del test. No obstant això, aquests animals van realitzar el test *elevated plus-maze* per mantenir les condicions dels animals, tot i que el seu comportament no va ser considerat en les anàlisis estadístiques. L'aparell va ser netejat curosament entre proves de diferents animals amb una solució al 20% (v / v) d'etanol.



* Imatge afegida per fer més entenedor el test *holeboard* (no forma part de l'article original). Imatge obtinguda de:
http://www.commercecorner.com/stoelting/stores/stoelting/categories/62015_hole_board-M.jpg

Elevated plus-maze

L'*elevated plus-maze* (EPM) està format per dos braços oberts i dos braços tancats amb parets, de manera que els braços del mateix tipus estan situats oposats l'un de l'altre. En la unió dels quatre braços hi ha una àrea central. Després de l'exposició del *holeboard*, el dia 46, es va situar als animals al centre de la plataforma de l'aparell mirant un dels braços tancats i se'ls va deixar que exploressin lliurement el *maze* durant 5 min. Es registrava cada vegada que un animal entrava en un braç amb les quatre extremitats (una visita), i la freqüència i durada de les visites al braç obert i tancat. Els animals que van caure del *plus-maze* es van excloure de les anàlisis. Les entrades als braços oberts i el temps passat en aquests es van calcular com el percentatge total d'entrades als braços i també es va calcular el temps total gastat en els dos braços respectivament (paràmetres rellevants per mesurar l'ansietat). El total d'entrades als braços es va considerar com un índex general de l'activitat motora [36]. L'aparell

es va netejar curosament entre proves de diferents animals amb una solució d'etanol al 20% (v / v).

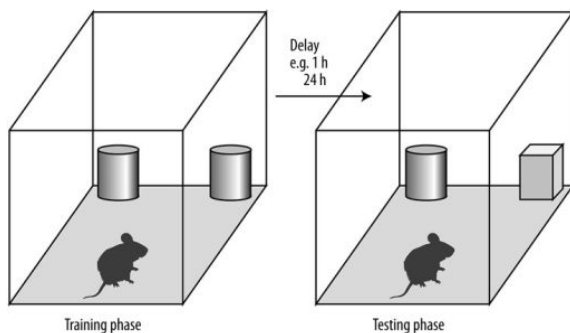


* Imatge afegida per fer més entenedor el test *elevated plus-maze* (no forma part de l'article original). Imatge obtinguda de:
http://www.limef.com/productImages/S60240_600.jpg

Novel object test

El *novel object test* (NOT) es realitza en un escenari quadrat amb les parets metàl·liques i un terra dividit en 36 quadres. El test es va realitzar com s'havia descrit anteriorment [37], i amb algunes petites modificacions [16]. Es va deixar explorar les rates lliurement l'escenari 5 min i durant 5 dies consecutius (període d'habitució). Es va gravar l'activitat dels animals per avaluar-ne el comportament i l'activitat motora, la deambulació, i el percentatge de temps emprat en l'àrea interna de la plataforma es va calcular dividint el temps emprat a l'interior de la plataforma entre el total de duració del test (5 min) i després multiplicant el resultat per 100. El dia del test (75), primer es va exposar a les rates a dos objectes idèntics (dues caixes de plàstic) d'entre 30 s i 4 minuts, és la sessió *d'entrenament*. Després de 4 h d'interval, es va exposar a les rates a un dels objectes que prèviament havia vist (objecte familiar, F1 o F2) i a un objecte nou no familiar (caixa metàl·lica de color) durant 3 minuts, *sessió del test*. Els objectes eren de la grandària de la rata i es van col·locar als cantons contigus, a 10 cm de les parets. Al principi de cada sessió els animals es van col·locar al centre de l'escenari mirant la paret oposada als objectes. Per a cada animal no es va canviar la posició dels objectes entre l'entrenament i la sessió del test. Tot i això, es va canviar la posició dels objectes per tal d'evitar la preferència espacial. Els aparells i els objectes es van netejar curosament entre els testos de diferents animals amb una solució d'etanol al 20% (v / v). Les dues sessions es van registrar amb vídeo per tal d'avaluar-les posteriorment. Es va registrar el temps emprat a explorar els objectes,

en el qual es considerava l'exploració d'un objecte sempre que els animals assenyalaven el seu nas cap a l'objecte a una distància \leq d'1 cm, mentre que girar al voltant d'ell, escalar-lo i/o mossegar-lo no es consideraven exploracions [16,37]. En la sessió del test, l'índex de discriminació es va calcular com la diferència entre el temps emprat en explorar l'objecte nou (N) i l'objecte familiar (F1 o F2) en relació amb el temps total emprat en explorar els objectes $[(N2F) / (N + F)]$. Es va assumir que els animals que exploraven un objecte familiar més que un objecte nou no eren capaços de discriminar entre els objectes. Els animals que van explorar menys de 30 s durant la sessió d'entrenament o que només van explorar un dels dos objectes durant la sessió d'entrenament es van excloure de l'anàlisi estadística.



* Imatge afegida per fer més entenedor el test *novel object test* (no forma part de l'article original). Imatge obtinguda de: https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/182/4280055/PMC4280055_medscimonit-20-2733-g002.png

Prepulse inhibition

L'últim test proposat no s'explica en aquesta activitat.

Mesures del plasma endocrí

Es van obtenir mostres de sang el dia 50 i el dia que van sacrificar els animals (89-92), es van centrifugar (3,000 rpm, 15 min. a 4 °C) i es va guardar a -30 °C fins que es van mesurar les dues hormones d'interès, la corticoesterona i la leptina.

Processament i anàlisi de cervell

Ja en edat adulta (89-92) es va sacrificar els animals i es va extreure el cervell per tal de disseccionar-lo sobre gel. Es van obtenir el còrtex frontal, l'hipocamp i l'hipotàlem i es van guardar a -80 °C.

* En l'article estan explicades la immunotransferència de l'escorça frontal i l'hipocamp, i l'anàlisi quantitativa per PCR de

l'hipotàlem, però s'ha considerat no incloure-les en aquesta activitat perquè és massa informació i per assolir els objectius plantejats no és necessari. Per a més informació veure l'article original.

Anàlisi estadística

Les dades de comportament, fisiològiques i endocrines s'han analitzat amb el test de tres factors d'ANOVA, considerant com a factors el sexe (femelles vs. mascles), el tractament amb cannabinoides (Vh vs. THC) i l'administració intermitent de MDMA (MDMA vs. solució salina). La immunotransferència i la PCR s'han analitzat amb un test d'ANOVA de dos factors considerant el sexe. Es van fer servir mesures repetides d'ANOVA per analitzar el guany de pes i les variacions en la temperatura. Adicionalment, es va fer un test d'ANOVA de dos factors (sexe o tractament farmacològic) per clarificar els resultats obtinguts. La freqüència d'esdeveniments (per exemple, morts i caigudes del EPM) es van analitzar amb un test de xi-quadrat. Totes les dades estadístiques es van dur a terme amb el SPSS 19.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

* D'aquest darrer apartat s'espera que vegeu que en qualsevol experiment científic cal una anàlisi bioestadística curosa de les dades i que aquest ha de constar a l'article perquè qualsevol persona pugui reproduir l'experiment. En cap cas s'espera que entengueu les eines emprades.

Resultats

Guany de pes corporal

Durant el tractament amb les drogues, les rates van guanyar pes de forma significativa $[F(2.5, 277.9) = 4579.31; p,0.001]$ i es van observar diferències entre sexes $[F(1,110) = 276.55; p,0.001]$, de manera que els mascles van guanyar més pes que les femelles. A més, es va detectar diferències entre sexes en l'administració de MDMA $[F(1,110) = 5.63; p,0.05]$. Els animals tractats amb MDMA van mostrar una reducció del pes corporal guanyat que va durar fins a l'últim dia de tractament (45) en mascles i femelles, fet que també es va observar amb el THC. Els animals tractats amb una combinació crònica de THC i MDMA van mostrar el menor guany de pes (Fig. 2, gràfics de l'esquerra).

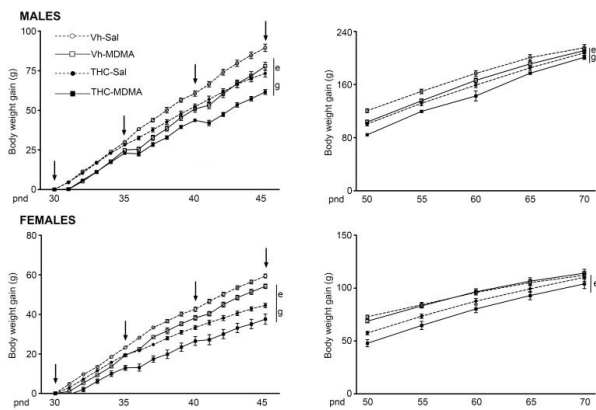


Fig 2. Evolució del guany de pes durant l'administració de droga (panell esquerre) i durant el període en què ja no s'administra (panell dret)

El guany de pes s'ha mesurat durant l'administració de la droga, del dia 28 al 45 i cada cinc dies des del dia 50 al 70. El guany de pes (en grams, g) s'ha expressat en mascles (panell superior) i en femelles (panell inferior) i el dia 30 s'ha establert com a dia de referència. Nombre d'animals per grup experimental: mascles, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-Sal (16), THC-MDMA (14); i femelles, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-SAL (16), THC-MDMA (12). D'acord amb les mesures establertes ANOVA ($P < 0.05$).

Mesura de la temperatura corporal

Les anàlisis revelen que el MDMA va augmentar significativament la temperatura del cos (és a dir, causa hipertèrmia) en mascles i femelles adolescents [$F(1,56) = 101.28$; $p, 0.001$ and $F(1,54) = 87.48$; $p, 0.001$], mentre que la interacció entre THC i MDMA només va ser evident en femelles [$F(1,54) = 4.63$; $p, 0.05$]. Per tant, l'administració de THC sembla compensar la hipertèrmia produïda per el MDMA (només en femelles). (Fig. 3, panells superiors). En els panells inferiors es mostra com els canvis en la temperatura van ser més llargs en els mascles que en les femelles.

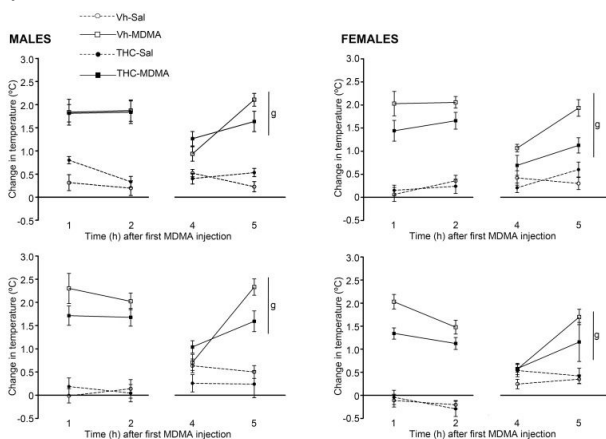


Fig 3. Canvis en la temperatura del cos en el primer dia de tractament amb MDMA (30) i l'últim (45).

La temperatura del cos es va mesurar abans de la primera injecció de MDMA (o Sal) per establir la temperatura basal, i després d'una, dos i quatre hores, també es va mesurar després de la segona injecció i una hora després. Les figures mostren el canvi de la temperatura rectal respecte la temperatura basal expressada en graus centígrads ($^{\circ}\text{C}$).

Test de comportament

*Les dades estadístiques d'aquest apartat de resultats (i dels següents) i les figures s'han suprimit per no fer feixuga i difícil la lectura, però en els resultats sempre s'inclouen tal com es pot veure en els apartats anteriors.

Holeboard. Cap de les dues drogues va mostrar efectes significatius en l'activitat locomotora. Els animals tractats amb THC van romandre més temps en la regió central de l'escenari (efecte ansiolític), però per contra, els animals que van rebre MDMA van mostrar un comportament d'exploració menor, ja que van explorar menys vegades i menys estona els forats del terra (efecte ansiogènic).

Elevated Plus-Maze. Independentment de la disminució de l'activitat locomotora, el tractament amb MDMA va fer que els animals visitessin més vegades i més estona els braços oberts (augment de les conductes de risc i la impulsivitat). A més, les rates femelles van explorar els braços oberts més estona que els mascles.

Open field. Les femelles van mostrar una activitat motora major que els mascles. L'administració de les drogues va tenir un efecte similar, una disminució de l'exploració de la regió central de l'*open field*, indicant un augment de l'emocionalitat/ansietat.

Novel Object Test. El test va mostrar que l'administració de THC només afectava l'índex de memòria de les femelles. A més, l'exploració dels objectes en la sessió del test va ser menor quan es va administrar MDMA.

Nivells d'hormones

Corticoesterona. Els nivells d'aquesta hormona van ser superiors en femelles que en mascles en les dues mesures preses (dies 50 i 90). Mentre l'administració amb THC no va afectar els nivells basals de corticoesterona en cap dels dos sexes, l'administració de MDMA va mostrar una disminució significativa en mascles.

Leptina. Partint que sense l'efecte de les drogues els mascles sempre presenten nivells més elevats de leptina, els resultats mostren que l'administració de THC produeix una disminució significativa en femelles.

* En l'article estan explicades l'expressió de proteïnes Arc i ERK 1 i 2 en el còrtex frontal i l'hipocamp, i també l'expressió

hipotalàmica del mRNA prepro-orexina. S'ha considerat no incloure-les en aquesta activitat perquè és massa informació i per assolir els objectius plantejats no és necessari. Per a més informació veure l'article original.

Discussió

El cànnabis i el MDMA són les substàncies més consumides pels adolescents, però els resultats del seu consum conjunt encara no són clars. Mentre un estudi recent ha estudiat els efectes sobre el comportament d'aquesta combinació en ratolins mascle [27], aquest és el primer estudi que analitza les diferències sexuals i realitza una valoració multidisciplinària des de nivells moleculars a comportamentals, realitzant anàlisis endocrines i metabòliques.

Pes corporal i temperatura

En aquest estudi, l'administració de THC durant l'adolescència ha disminuït el guany de pes corporal en rates [15,34], fet que s'ha apreciat abans en femelles que en mascles. Aquest efecte podria estar relacionat amb la típica reducció de menjar observada després d'una exposició crònica a cannabinoides [17], que es podria deure a una menor activitat dels seus receptors ([receptors cannabinoides CB1](#)) en diferents regions del cervell [50]. L'administració de MDMA també ha reduït el guany de pes tant en mascles com en femelles, tal com mostren estudis anteriors [51]. El tractament amb MDMA durant l'adolescència ha demostrat un deteriorament del creixement en rates [6] i ratolins [52], probablement a causa dels efectes anorèxics ([sensació de no-gana](#)) de la droga i de la pèrdua d'aigua per evaporació a causa d'un augment de la respiració [35]. A més, el guany de pes va ser menor en els mascles i les femelles adolescents tractades amb una combinació de THC i MDMA, suggerint que l'efecte d'aquestes drogues és additiu ([se sumen](#)), tot i que aquesta possibilitat no s'ha conclòs en estudis previs realitzats en ratolins mascles adolescents [27]. A més, després del tractament amb les drogues la pèrdua de pes va persistir en el temps.

Tal com s'esperava, el MDMA va causar hipertèrmia ja des de la primera injecció (30) en ambdós sexes, coincidint amb estudis previs realitzats en rates adultes [53] i adolescents [27]. Per contra, l'administració sola de THC no va modificar la temperatura. Tot i que el THC produeix hipotèrmia en rosegadors, els efectes dels cannabinoides sobre la temperatura són variables i depenen de la dosi usada i de la

temperatura ambient, entre altres factors [27,54]. De forma interessant, el THC va atenuar la hipertèrmia induïda per el MDMA en les femelles i s'ha vist que l'administració d'agonistes sintètics cannabinoides ([fàrmacs que imiten l'efecte del THC](#)) prevenen la hipertèrmia produïda per el MDMA [26,27].

Resultats comportamentals

L'activitat motora general no es va modificar per cap de les dues drogues en el test *holeboard* ([mirar materials i mètodes per resoldre dubtes sobre el test](#)). Tot i això, el THC va disminuir la distància recorreguda a l'interior de l'escenari, mentre que amb el MDMA es va disminuir la freqüència i el temps explorant els forats, tal com havien mostrat estudis anteriors [27]. Les dades suggereixen que des del primer dia de tractament farmacològic les dues drogues van augmentar l'ansietat d'aquest model animal. Per contra, l'administració de MDMA va augmentar l'exploració dels braços oberts en el test *elevated plus-maze (EPM)*, fet que pot considerar-se com un efecte ansiolític [36] o com un increment de les conductes de risc [15, 56]. A més, el fet que els animals tractats amb MDMA caiguessin més de l'*EPM* que la resta reforça l'augment de les conductes de risc i la impulsivitat. En efecte, dades d'estudis anteriors ja havien observat que l'administració intermitent de MDMA augmentava la impulsivitat en el *EPM* [27,35] igual que en els consumidors d'èxtasi [57,58]. La combinació de THC i MDMA va disminuir el temps d'exploració de la regió central de l'*open field*, fet que suporta l'increment de l'ansietat i l'augment de la impulsivitat. D'acord amb la bibliografia, l'administració de MDMA en rates [51] i en humans [59] podria explicar l'augment de l'ansietat en adults. Es va observar diferències entre sexes, ja que les rates femelles van explorar més estona els braços oberts en el *EPM* que els mascles i van presentar una major activitat motora en el test *open field*, tal com havíem trobat en estudis previs [16].

En el test *novel object recognition (NOT)*, l'administració de THC durant l'adolescència va afectar la memòria de les femelles, suggerint una major vulnerabilitat d'aquest sexe als efectes del THC. D'aquesta manera, el consum crònic de THC en rates adolescents s'ha associat a comportaments depressius en femelles adultes però no en mascles [34]. El període prepubertat sembla ser crític pel desenvolupament del

sistema endocannabinoide i l'exposició crònica durant aquest període podria comportar un deteriorament funcional persistent del sistema [19,20,21]. En efecte, l'administració crònica de cànnabis durant el període preadolescent induïx un deteriorament de la memòria en rates adultes [16,18], tot i que aquesta alteració podria no produir-se en dosis baixes de THC [61].

* En l'article, la discussió sobre canvis comportamentals segueix. També està explicada la discussió sobre els nivells de les hormones i dels canvis neuroquímics. S'ha considerat no incloure-les en aquesta activitat perquè és massa informació i per assolir els objectius plantejats no és necessari. Per a més informació veure l'article original.

Conclusions

S'havia suggerit que l'administració aguda de THC i MDMA podia tenir efectes oposats en els animals, encara que en la seva administració crònica els efectes negatius podien ser sumatoris. [22]. L'animal model utilitzat en aquest estudi imita els hàbits de consum dels adolescents i, per tant, podria proporcionar una imatge més fiable de les conseqüències perjudicials de l'abús de diverses drogues, particularment del THC i el MDMA, drogues que sovint són co-abusades entre els adolescents. Tot i que en una exposició a curt termini podria haver-hi un equilibri aparent dels efectes perjudicials de les drogues (temperatura corporal), sembla que en una exposició repetida passa tot el contrari (com es pot veure en el pes corporal). Possiblement, els efectes de comportament del THC i/o MDMA estan relacionats amb alteracions del sistema de neurotransmissió, sistemes que ja s'han vist alterats després del consum d'aquestes drogues. Per exemple, l'administració de MDMA ha mostrat una disminució dels terminals nerviosos serotoninèrgics en diverses regions del cervell i això podria explicar l'increment de l'ansietat i de les conductes de risc, així com la pèrdua de pes. Per altra banda, l'administració crònica de THC ha mostrat canvis permanents en el sistema endocannabinoide que podrien estar relacionats amb dèficits en la memòria evidents en les femelles. Calen més estudis per desentranyar els mecanismes moleculars subjacents dels efectes causats a llarg termini d'ambdues drogues.

Tot i les limitacions experimentals, com l'aplicació de només una de les drogues i l'ús de només una dosi de MDMA i dosis creixents de THC, la selecció d'aquest model animal per mimetitzar els hàbits de consum dels adolescents obre noves vies per la recerca en el camp del

consum de drogues. A més, l'estudi endocrí i neuroquímic en el mateix animal i a diferents moments ens permet establir associacions importants, tot i que caldrà realitzar experiments addicionals per obtenir evidències causals d'aquestes relacions. Les dades presentades revelen diverses diferències sexuals que segurament es deuen a causa dels efectes organitzadors de les hormones gonadals durant el període de diferenciació sexual del cervell [86] i/o dels efectes que tenen durant el període preadolescent [20,28] (la testosterona en el cas dels homes i la progesterona i l'estradiol en el cas de les dones). Un millor coneixement dels mecanismes que regulen els efectes sexuals dimòrfics dels cannabinoides [20,28] i del MDMA [87] facilitarà el desenvolupament d'estratègies de prevenció i terapèutiques sexe-específiques .

Referències

1. Cunningham JI, Raudensky J, Tonkiss J, Yamamoto BK (2009) MDMA pretreatment leads to mild chronic unpredictable stress-induced impairments in spatial learning. *Behav Neurosci* 123: 1076–1084.
2. Beveridge TJ, Mehan AO, Sprakes M, Pei Q, Zetterstrom TS, et al. (2004) Effect of 5-HT depletion by MDMA on hyperthermia and Arc mRNA induction in rat brain. *Psychopharmacology (Berl.)* 173: 346–352.
3. Parrott AC (2004) MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) or ecstasy: the neuropsychobiological implications of taking it at dances and raves. *Neuropsychobiology* 50: 329–335.
4. Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2009) Neurotoxicity of drugs of abuse—the case of methylenedioxyamphetamines (MDMA, ecstasy), and amphetamines. *Dialogues Clin Neurosci* 11: 305–317.
5. Ludwig V, Mihov Y, Schwarting RK (2008) Behavioral and neurochemical consequences of multiple MDMA administrations in the rat: role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 189: 52–64.

* Només s'han citat 5 de les 87 referències de l'article original.

Responen les preguntes de l'apartat que us toqui treballar:

Títol i abstract:

1. Quines característiques hauria de tenir un bon títol?
2. Sabríeu identificar en el text les principals parts d'un *abstract*? Les parts que el formen són: introducció al context, pregunta /hipòtesi /objectiu, mètodes, resultats i conclusió.
3. Per què creieu que serveix l'*abstract* o resum?
4. A part del títol i l'*abstract*, què s'hi acostuma a trobar al principi d'un article?

Introducció:

1. Identifiqueu en el text on s'expliqui per què és important realitzar aquest estudi.
2. Què creieu que ha de contenir una bona introducció?
3. Assenyaleu tres referències diferents i expliqueu per què creieu que els investigadors les han afegit.
4. Creieu que és un apartat important per donar la vostra opinió (discurs subjectiu)?

Materials i mètodes:

1. Per què creieu que tots els articles científics contenen aquest apartat?
2. Assenyaleu en el text un exemple en què s'expliqui les variables control emprades, és a dir, les variables que són constants i que romanen sense canvis durant un experiment.
3. Us sorprèn trobar referències bibliogràfiques en aquest apartat?
4. Creieu que un gràfic o una figura que resumeix el disseny experimental pot ser útil? (mirar Fig. 1)

Resultats

1. Com estan distribuïts els resultats de l'estudi? Segueixen un ordre cronològic?
2. Creieu que és un apartat on només s'expliquen les troballes obtingudes o que també s'interpreten els resultats? Expliqueu algun resultat que obtenen els investigadors.
3. Relacionat amb la pregunta anterior, està redactat de forma objectiva o subjectiva? Poseu dos exemples.

4. Digueu si la següent afirmació és certa o falsa i per què: En els resultats és on s'acostumen a trobar les taules i figures de l'article científic.

Discussió:

1. Per què serveix la discussió? És important interpretar els resultats obtinguts?
2. Creieu que és important contrastar els vostres resultats amb estudis previs? Assenyaleu un exemple on l'estudi coincideixi amb estudis previs i un article on difereixi.
3. Els problemes experimentals s'han d'escriure o s'han d'intentar amagar per fer veure que "l'experiment ha sigut rodó"?
4. Digueu si la següent afirmació és certa o falsa i per què: en la discussió s'acostumen a plantejar noves preguntes que sorgeixen arran d'aquesta investigació.

Conclusió:

1. Què creieu que conté o ha de contenir una bona conclusió (si és que l'article en presenta)?
2. Assenyaleu en el text les limitacions d'aquest estudi.
3. Aquest article té o tindrà algun impacte a la societat? Assenyaleu en el text on s'indica.
4. Sabríeu resumir l'article en cinc línies com a màxim?