



UNIVERSITAT POMPEU FABRA

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Unitat de Neurofarmacologia

Grup de Recerca de Neurobiologia del Comportament

TESIS DOCTORAL:

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN
EL CONTROL DE LAS RESPUESTAS EMOCIONALES
RELACIONADAS CON LOS TRASTORNOS AFECTIVOS**

Memoria presentada por

Ester Aso Pérez

Para optar al grado de Doctor

Barcelona 2008



Olga Valverde Granados, Catedrática de la Universitat Pompeu Fabra y Rafael

Maldonado López, Catedrático de la Universitat Pompeu Fabra

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "Participación del sistema cannabinoide endógeno en el control de las respuestas emocionales relacionadas con los trastornos afectivos" presentada por Ester Aso Pérez, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universitat Pompeu Fabra, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a efectos oportunos, firman el presente certificado a 30 de octubre de 2008.

Olga Valverde Granados

Rafael Maldonado López

A mi hermana Lidia

Después de recorrer el largo camino que me ha traído hasta aquí no puedo más que recordar y agradecer profundamente a todos los que me han apoyado durante todo este tiempo.

En primer lugar, quiero agradecer a Olga y Rafael la oportunidad que me han brindado de iniciar mi andadura en la ciencia a su lado y el esfuerzo realizado para dirigir esta Tesis Doctoral. La confianza que habéis depositado en mí durante todos estos años ha sido un apoyo fundamental para realizar este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a Andrés, Fernando y Patricia por su aliento continuo, por su maestría y, sobretodo, por su amistad. Habéis sido pilares imprescindibles para mí. No tengo palabras suficientes para reconocer lo mucho Andrés que ha aportado a esta Tesis y la paciencia que ha demostrado para iniciarme en el mundo de la biología molecular. Es un placer trabajar contigo, Andrés, y ya ni te cuento lo que es pasar horas y horas en los aeropuertos a tu lado... De mi particular enciclopedia que es Fernando, no puedo decir más que la confianza absoluta que me transmite a nivel profesional y personal hace que le tenga un cariño muy sincero. Y de ti, Pato, sólo diré que hoy, echando la vista atrás, sé que lo mucho que he aprendido de ti no es más que una mínima parte de todo lo que puedes dar. Muchas gracias, Pato, por tu manera generosa de ofrecer tu consejo, ¡y de alegrar como nadie las fiestas!

Durante este tiempo ha pasado mucha gente por el laboratorio que ha dejado en mí un recuerdo imborrable. Gràcies, Anna i Lupe per haver sigut els meus referents durant la tesi i per la vostra amistat!! Y a vosotras, Patricia y Vicky, muchísimas gracias por vuestros consejos, por vuestra manera particular de ver las cosas y por los buenos momentos que hemos pasado juntas. El laboratorio ya no es el mismo desde que nos dejasteis.

Mención aparte merece mi querida Graciélita. Sin que seas realmente consciente y a pesar de los 14000 km que nos separan, has contribuido a esta Tesis enormemente. Los años que pasaste aquí nos han dejado huella a todos los que te conocimos y te has ganado un lugar en nuestro coranzoncito.

No puedo olvidar y dejar de agradecer lo mucho que han contribuido a realizar este trabajo personas con unas cualidades excelentes. Cristina, Dulce, Raquel, Marta, Bego, Neus, vuestro trabajo y amistad son inestimables.

También quisiera agradecer la ayuda que me han prestado Andreea, Emma, Clara, Lola, Xevi y los demás predocs que han compartido conmigo esta aventura de la Tesis. Andreea, esas terapias camino a la estación son de lo más reconfortante!

Gracias, Jose, por intentar que mejore mis golpes en el frontón. Moltes gràcies, Miquel-Àngel, per tots els teus consells i la teva bona voluntat per solucionar

sempre els problemes. Gracias, Elena, por esas meriendas temáticas. Gràcies, Miquel, pel teu bon humor. Y a los demás compañeros del laboratorio, muchas gracias por vuestros ánimos y consejos!

Quisiera agradecer igualmente a Jaume y Mariví sus lecciones sobre genética...y, especialmente a Jaume, el haber hecho que fenotipar ratones nunca antes hubiera sido tan divertido.

I am in debt with Laurence and Tibo because they initiated me into the electrophysiology world. They transmitted me a piece of their passion for hearing the music of the neurons. I would like to specially thank Laurence her kind advices about our results and her affection. I enjoyed very much my stay in Paris with you. I promise next time I will learn French!

De la misma forma, quisiera agradecer a Lupe Mengod y a su gente, especialmente a Rocío, su ayuda en el tramo final de la Tesis. En vuestro laboratorio es fácil sentirse como en casa al cabo de unos pocos minutos, muchísimas gracias por vuestra amabilidad.

A mis amigos de toda la vida de Sant Feliu, Sara, David, Raúl, Marga, Roberto, Rosa, Óscar, Sandra, Tito, Mire...y a los que los años de la facultad nos unieron, Sara, Cristina, Jordi, Anna, Inma...quiero daros las gracias por lo mucho que me he divertido con vosotros todos estos años y por lo que habéis contribuido a que pudiera desconectar del trabajo de vez en cuando...

Por último, quiero dar las gracias a mis padres y a mis hermanos por el apoyo incondicional y el cariño que me han dado siempre. Espero algún día poder devolveros parte de lo mucho que me habéis dado. En el regazo de mis padres conocí los primeros números y las letras cuando era una niña y desde entonces no he dejado de aprender con ellos. A Carlos le debo el saber aprovechar hasta el último suspiro sin perder nunca la calma, y a Luis el entender un poquito cómo funciona el mundo...y el haber alargado mi vida unos cuantos años con tantas carcajadas! Pero me vais a permitir que esta Tesis se la dedique a Lidia. Ha sido el mejor referente que he podido tener en todas las etapas de mi vida. Su bondad y su manera de disfrutar trabajando y de enfrentarse a los problemas con tesón y buena voluntad han sido para mí un ejemplo siempre. Muchas gracias, Lidia, por ser la alegría de la familia.

Y para ti, Jose, se me acabaron hace mucho tiempo las palabras de agradecimiento por lo mucho que haces por mí. A ti espero dedicarte algo más que una Tesis.

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN	1
1. Trastornos emocionales: depresión y ansiedad	3
1.1. Consideraciones generales	3
1.2. Neurobiología de la ansiedad	3
1.2.1. Conceptos generales	4
1.2.2. Sustratos neurobiológicos de la ansiedad	5
1.2.2.1. Circuitos neuronales	5
1.2.2.2. Neuroquímica de la ansiedad.....	7
1.2.3. Ansiedad asociada al consumo de sustancias	11
1.3. Neurobiología de la depresión.....	12
1.3.1. Introducción a la depresión	12
1.3.2. Sustratos neurobiológicos de la depresión	15
1.3.2.1. Sistema serotoninérgico e hipótesis monoaminérgica	15
1.3.2.1.1. Sistema serotoninérgico	15
1.3.2.1.2. Hipótesis monoaminérgica de la depresión.....	18
1.3.2.2. Estrés y control del eje HPA	20
1.3.2.3. Plasticidad neuronal.....	24
1.3.2.3.1. Hipótesis neurotrófica	24
1.3.2.3.2. Neurotoxicidad y neurogénesis	27
1.3.2.4. Motivación y circuitos de recompensa	28
1.4. Modelos animales	31
1.4.1. Modelos animales de trastornos de ansiedad.....	32
1.4.2. Modelos animales de trastornos depresivos	34
2. Sistema endocannabinoide y control de la emoción	37
2.1. Introducción al sistema endocannabinoide.....	37
2.1.1. Cannabinoides endógenos	37
2.1.2. Cannabinoides exógenos.....	40
2.1.3. Receptores cannabinoides	41
2.1.4. Mecanismos de transducción de señal asociados a los receptores cannabinoides.....	43
2.1.5. Funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide	45
2.1.6. Los endocannabinoides como mensajeros retrógrados.....	46
2.2. Sistema endocannabinoide y ansiedad	47
2.3. Sistema endocannabinoide y depresión.....	48

2.3.1. Evidencias clínicas y preclínicas	48
2.3.2. Sistema endocannabinoide y mecanismos implicados en la depresión	50
3. Nicotina: ansiedad y disforia asociada a la abstinencia	54
3.1. Nicotina y sistema colinérgico	54
3.2. Nicotina y ansiedad	56
3.3. Síndrome de abstinencia de nicotina	56
3.4. Interacción con el sistema endocannabinoide	57
OBJETIVOS	61
RESULTADOS	65
Artículo 1:	67
BDNF impairment correlates with depressive-like behavior in CB ₁ cannabinoid knockout mice.	
<u>Aso E</u> , Ozaita A, Valdizán EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O. <i>J Neurochem</i> , (2008) 105(2):565-72.	
Artículo 2:	77
CB ₁ knockout mice display impaired functionality of 5-HT _{1A} and 5-HT _{2A/2C} receptors.	
Mato S, <u>Aso E</u> , Castro E, Martín M, Valverde O, Maldonado R, Pazos A. <i>J Neurochem</i> , (2007) 103(5):2111-20.	
Artículo 3:	89
Lack of CB ₁ receptor activity deregulates serotonergic neurotransmission.	
<u>Aso E</u> , Renoir T, Mengod G, Ledent C, Hamon M, Maldonado R, Lanfumey L, Valverde O. <i>J Neurochem</i> (En revisión).	
Artículo 4:	127
Delta9-tetrahydrocannabinol decreases somatic and motivational manifestations of nicotine withdrawal in mice.	
Balerio GN, <u>Aso E</u> , Berrendero F, Murtra P, Maldonado R. <i>Eur J Neurosci</i> (2004) 20:2737-48.	
Artículo 5:	141
Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice.	

Balerio GN, Aso E, Maldonado R.
Psychopharmacology (Berl) (2006) 14: 1-10.

DISCUSIÓN **153**

1. Participación del sistema endocannabinoide en los trastornos emocionales de tipo depresivo 155
2. Participación del sistema endocannabinoide en los trastornos de ansiedad y en el síndrome de abstinencia asociados al consumo de nicotina 164

CONCLUSIONES **169**

BIBLIOGRAFÍA **173**

ANEXO **197**

Artículo 6: **199**

Involvement of the opioid system in the effects induced by nicotine in anxiety-like behaviour.

Balerio GN, Aso E, Maldonado R.
Psychopharmacology (Berl) (2005) 181:260-9.

Artículo 7: **209**

Abnormal embryonic development, craniofacial morphogenesis and altered behaviour in mice deficient for the N-terminal region of TFII-I.

Lucena J, Pezzi S, Aso E, Valero MC, Carreiro C, Dubus P, Sampaio A, Barbero JL, Maldonado R, Pérez Jurado LA, Campuzano V.
PNAS (En segunda revisión).

INTRODUCCIÓN

1. TRASTORNOS EMOCIONALES: DEPRESIÓN Y ANSIEDAD

1.1 Consideraciones generales

Los trastornos del estado de ánimo y de ansiedad son las formas más prevalentes de enfermedad mental. Según un estudio realizado en la población adulta europea sobre la epidemiología de las enfermedades mentales (Nutt y cols, 2007), un 14.7% de las personas padece algún tipo de trastorno del estado de ánimo a lo largo de su vida, cifra muy similar a la de las personas que sufren un trastorno de ansiedad (14.5%). La prevalencia de estos tipos de trastornos emocionales en Europa es comparable a la observada en USA (Kessler y Wang, 2008) e indica que los trastornos emocionales son un serio problema de salud en la sociedad occidental. En este sentido, un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud alerta sobre las importantes implicaciones sociales y económicas asociadas a estas enfermedades mentales, revelando que los trastornos emocionales están asociados a un incremento de la mortalidad y a un alto porcentaje de las discapacidades laborales que se registran cada año en los países desarrollados (World Health Organization, 2002).

A pesar del impacto social de los trastornos emocionales y del esfuerzo realizado en el campo de la investigación durante décadas en la búsqueda de tratamientos eficaces para estos trastornos, el conocimiento actual sobre estas enfermedades mentales continúa siendo limitado y los tratamientos existentes son adecuados tan sólo para el 45.8% de la población afectada, en términos globales (Fernández y cols, 2007). Por ello, resulta fundamental profundizar en el conocimiento de estas patologías para abordar la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

Existe una alta comorbilidad entre los trastornos de ansiedad y del estado de ánimo, con un 90% de los pacientes con trastornos importantes de ansiedad experimentando algún episodio depresivo a lo largo de la vida y un 85% de los pacientes deprimidos padeciendo síntomas de ansiedad (Gorman, 1996). Estos datos sugieren que los sustratos neurológicos implicados en ambas patologías puedan ser comunes. En este sentido, numerosas evidencias apuntan hacia una desregulación de los circuitos neuronales específicos del sistema córtico-límbico, que regulan las respuestas al estrés, el humor y las respuestas emocionales, similar en ambos trastornos de ansiedad y del estado de ánimo (Ressler y Mayberg, 2007) y que son objeto de revisión en los siguientes apartados.

1.2 Neurobiología de la ansiedad

1.2.1 Conceptos generales

La ansiedad puede considerarse como un componente adaptativo de la respuesta al estrés ante circunstancias que amenazan la integridad física o emocional del individuo. Se caracteriza por un incremento de las facultades perceptivas que conlleva una estimulación de la atención y del cumplimiento de tareas, que preparan al individuo para hacer frente a las situaciones que se le presentan. La ansiedad tiene por tanto una función muy importante relacionada con la supervivencia. Sin embargo, si la respuesta frente al estímulo es desproporcionada y persiste por encima del nivel de adaptación, la ansiedad puede convertirse en patológica.

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DMS-IV-TR, American Psychiatric Association, 2005) permite clasificar, en función de los síntomas, los diferentes tipos de trastornos de la ansiedad:

- *Trastorno de Pánico*: presencia de crisis de pánico recurrentes, inesperadas y espontáneas.
- *Fobia*: temor intenso y persistente, excesivo e irracional, desencadenado por la presencia o anticipación de un objeto o situación específicos.
- *Trastorno Obsesivo-compulsivo*: pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes que se experimentan como intrusos, no deseados e inapropiados y causan ansiedad o malestar significativos y que inducen comportamientos o actos mentales de carácter repetitivo.
- *Trastorno por Estrés Postraumático*: malestar psíquico y fisiológico intenso ante la exposición a estímulos asociados a un acontecimiento traumático que es reexperimentado persistentemente a través de recuerdos y sueños recurrentes durante un periodo de tiempo superior a un mes.
- *Trastorno por Estrés Agudo*: sintomatología similar al trastorno por estrés postraumático pero con una duración de las manifestaciones clínicas menor de 4 semanas que aparecen en el primer mes que sigue al acontecimiento traumático que ocasiona el trastorno.
- *Trastorno de Ansiedad Generalizada*: ansiedad persistente en el tiempo y generalizada, no estando restringida a una situación en particular.
- *Trastornos de Ansiedad Secundarios*: asociados a enfermedades médicas o al consumo de sustancias (*Ver Apartado 1.2.3*).

Aunque existen evidencias clínicas bien establecidas que diferencian las modalidades de trastornos de la ansiedad, éstos comparten numerosas similitudes, presentan una alta comorbilidad entre ellos y suelen responder a los mismos tratamientos. La aproximación a la ansiedad realizada en este capítulo se centra en los puntos convergentes entre los diversos trastornos. Se presta únicamente una atención especial a la ansiedad inducida por el consumo de sustancias, puesto que es objeto específico de estudio de parte de los principales trabajos que conforman la presente Tesis Doctoral.

Los síntomas de la ansiedad son muy diversos, entre los que predomina una hiperactividad vegetativa que se manifiesta con taquicardia, taquipnea, midriasis, sensación de ahogo, temblores en las extremidades, sensación de pérdida de control o del conocimiento, transpiración, rigidez muscular, debilidad muscular, insomnio, inquietud motora, dificultades para la comunicación y pensamientos negativos y obsesivos. El amplio espectro de síntomas de la ansiedad es reflejo de la complejidad de los sustratos neurobiológicos implicados en la manifestación de la ansiedad, como se describe en el apartado siguiente.

1.2.2 Sustratos neurobiológicos de la ansiedad

1.2.2.1 Circuitos neuronales

La ansiedad puede entenderse como una evaluación del riesgo frente a estímulos emocionales que pueden resultar inicialmente tanto gratificantes como aversivos. Esto sugiere que los sustratos neuronales subyacentes a los comportamientos asociados a la ansiedad incluyen los circuitos asociados a la toma de decisiones basadas en la predicción de probabilidades y los circuitos de recompensa y de aversión. De esta manera, las estructuras corticolímbicas desempeñan un papel fundamental en la integración del componente emocional y cognitivo de los estados de ansiedad. De entre todas las estructuras implicadas en la ansiedad, la más relevante es la amígdala puesto que recibe la información sensorial y es capaz de iniciar las respuestas comportamentales y vegetativas proyectando sobre áreas motoras y núcleos del tronco cerebral, como se representa en la Figura 1. La información sensorial alcanza la amígdala por dos vías principales: una vía monosináptica rápida desde el núcleo del tracto solitario a través del núcleo parabraquial o el tálamo sensorial y una vía multisináptica de acción retardada desde la corteza primaria sensorial a través de la transmisión córtico-talámica, que permite un procesamiento de la información de más alto nivel. Las principales eferencias sobre las que proyecta la amígdala son: el *locus coeruleus* (aumenta la liberación de noradrenalina, la cual contribuye al incremento de la atención), la

sustancia gris periacueductal (responsable de los comportamientos defensivos), el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (activa el eje HPA, consolidando la respuesta al estrés), el núcleo hipotalámico lateral (estimula el sistema nervioso simpático) y el núcleo parabraquial (modula la frecuencia respiratoria). La información contextual, sobre el ambiente en el que se producen los estímulos, es almacenada en el hipocampo y proyectada directamente hacia la amígdala. Así, el hipocampo es una estructura esencial en las respuestas condicionadas que generan ansiedad anticipatoria y en la coordinación y aprendizaje de las respuestas globales ante amenazas o situaciones adversas (Gorman y cols, 2000).

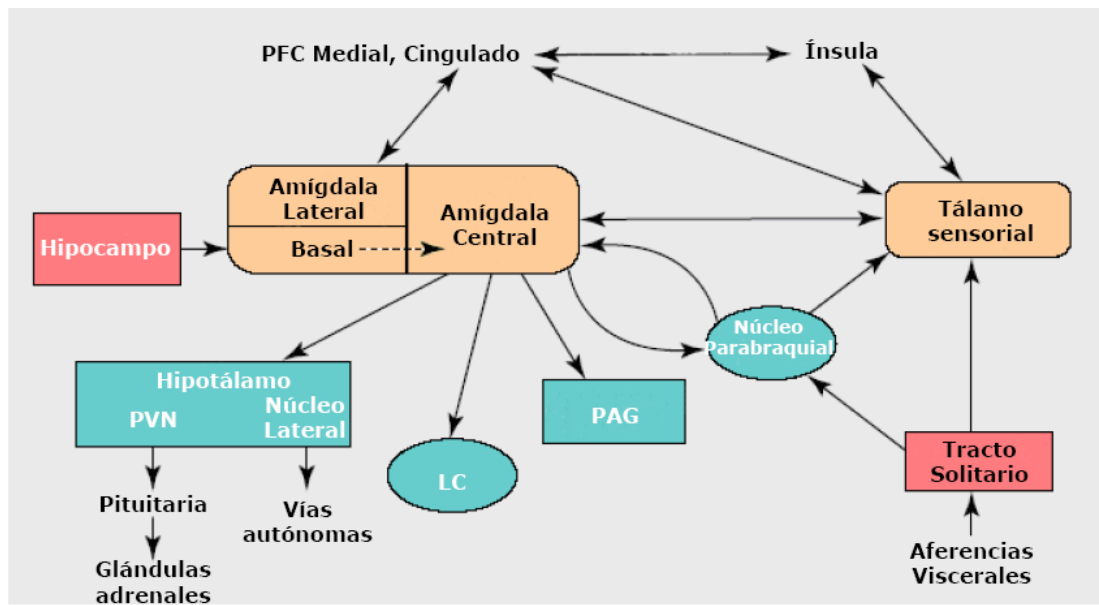


Figura 1. Circuitos neuronales implicados en la ansiedad. La amígdala desempeña un papel central en la integración de los estímulos emocionales y la coordinación de las respuestas. Adaptado de Gorman y cols (2000).

A pesar de la amplia aceptación de la amígdala y del hipocampo como estructuras clave en los fenómenos de la ansiedad, otras estructuras cerebrales están generando un interés creciente. De entre ellas, cabe destacar la corteza insular o ínsula por su papel integrador de la información proveniente de la amígdala, núcleo *accumbens* y corteza orbitofrontal que desempeña una función fundamental en la experiencia subjetiva emocional (Paulus y Stein, 2006). En la ínsula se genera una señal interoceptiva que predice la diferencia entre el estado actual del cuerpo y el estado futuro frente a un estímulo determinado que, en individuos propensos a los trastornos de ansiedad, puede ser aumentada debido a una expectación exagerada y aversiva que genera respuestas maladaptativas y estados de ansiedad.

1.2.2.2 Neuroquímica de la ansiedad

Una serie de neurotransmisores y neuropéptidos específicos modulan los circuitos neuronales citados anteriormente, participando en las respuestas de la ansiedad (Millan, 2003). Estos compuestos neuroquímicos se liberan durante las situaciones de estrés y preparan al organismo para afrontar esas situaciones, incrementando la atención y la vigilancia, modulando la memoria y optimizando la utilización de la energía corporal. Cuando la activación de estas respuestas se produce de manera crónica puede inducir alteraciones en la función de estos compuestos, con consecuencias patológicas. Los principales neurotransmisores y neuropéptidos implicados en el control de la ansiedad son:

- la **noradrenalina**: la liberación de noradrenalina inducida por las situaciones de estrés produce un incremento de la atención que permite mejorar las posibilidades de adaptación del organismo. Las neuronas noradrenérgicas se encuentran principalmente en el *locus coeruleus* y proyectan sobre áreas implicadas en la integración y la manifestación de las respuestas a la ansiedad, tales como la corteza prefrontal, la amígdala, el hipocampo, el núcleo del tracto solitario, la sustancia gris periacueductal, el tálamo y el hipotálamo. Las eferencias del *locus coeruleus* activan el sistema nervioso autónomo produciendo diversos efectos como la activación de los sistemas cardiorrespiratorios y la supresión de las funciones urogenitales y gastrointestinales (Tsigos y Chrousos, 2002). Los trastornos de ansiedad se asocian a una función incrementada y sostenida de las neuronas noradrenérgicas situadas en el *locus coeruleus*, que puede conducir a una desregulación de la capacidad de atención y del rendimiento cognitivo (Bremner y cols, 1996a; Bremner y cols, 1996b). Así, sustancias como la clonidina, que es un agonista de los autorreceptores adrenérgicos α_2 y que por tanto disminuye la actividad de la noradrenalina, tienen un efecto ansiolítico (Charney y Redmond, 1983). De la misma forma, sustancias como el propranolol, que bloquean los receptores β adrenérgicos, son usadas para tratar los síntomas vegetativos de la ansiedad (Emilien y Maloteaux, 1998).
- la **serotonina** (5-HT): diferentes tipos de estrés estimulan la liberación de 5-HT en la corteza prefrontal, núcleo *accumbens*, amígdala e hipotálamo lateral (Kent y cols, 2002), que puede producir efectos ansiolíticos o ansiogénicos dependiendo de la región cerebral implicada y del tipo de receptor serotoninérgico activado. Las alteraciones en la neurotransmisión de 5-HT observadas en los trastornos de ansiedad pueden deberse o bien a una

desregulación de la liberación de 5-HT y/o su recaptación o bien a una respuesta alterada a la señal inducida por la 5-HT. En el primer caso, estarían implicados los receptores presinápticos y/o el transportador de 5-HT, mientras que en el segundo caso las alteraciones se deberían a un mal funcionamiento de los receptores postsinápticos. Existen evidencias controvertidas sobre la naturaleza del control ejercido por la 5-HT en los fenómenos de ansiedad porque si bien la estimulación de los receptores presinápticos, que inhiben la actividad serotoninérgica, produce un efecto ansiolítico y la estimulación de los receptores postsinápticos incrementa los niveles de ansiedad (De Vry, 1995), uno de los tratamientos habituales de estos trastornos es la administración de compuestos que inhiben la recaptación de 5-HT e incrementan el tono serotoninérgico. Esta aparente controversia se debe a la complejidad de acción de la 5-HT y a la necesidad de comprender en profundidad los mecanismos de acción de los fármacos inhibidores de la recaptación de la 5-HT. *(Información detallada sobre el sistema serotoninérgico en el Apartado 1.3.2.1.1)*

- el **ácido gamma-aminobutírico** (GABA): es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. Las estructuras corticolímbicas implicadas en la modulación de los estados de ansiedad, como la amígdala, el hipocampo y la sustancia gris periacueductal, contienen las principales redes de interneuronas GABAérgicas del cerebro. Estas interneuronas ejercen un efecto inhibitorio sobre la liberación de los principales neurotransmisores implicados en las respuestas al estrés y la ansiedad, participando por tanto de manera decisiva en el control del balance homeostático (Kalueff y Nutt, 2007). De hecho, las sustancias más utilizadas como ansiolíticos y sedantes, las benzodiazepinas, modulan la actividad GABAérgica aumentando la potencia, la duración y la amplitud de las acciones del GABA a través de la unión al receptor GABA_A (Millan, 2003).
- el **glutamato**: es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. La ansiedad está asociada a una sobreexcitación neuronal en respuesta al estrés, que se debe a una desregulación del balance entre la transmisión inhibitoria (GABA) y excitatoria (glutamato) (Simon y Gorman, 2006). Sustancias que disminuyen la actividad glutamatérgica, como el inhibidor de la liberación de glutamato riluzol, son efectivas para el tratamiento de la ansiedad (Mathew y cols, 2005).

- la **acetilcolina**: participa en la regulación bidireccional de los niveles de ansiedad activando los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), que inducen la liberación de diversos neurotransmisores en áreas cerebrales implicadas en las manifestaciones de la ansiedad (Picciotto y cols, 2002). *Ver Apartado 3.2.*
- los péptidos **opioides**: los compuestos endógenos que activan los tres tipos de receptores opioides (receptores mu, delta y kappa), que se encuentran ampliamente distribuidos a nivel central, modulan los niveles de ansiedad mediante el control que ejercen sobre la actividad de otros neurotransmisores (Millan, 2003). Los receptores mu y kappa ejercen una acción opuesta al receptor delta sobre la ansiedad, puesto que el bloqueo del receptor delta induce un incremento de los niveles de ansiedad mientras que el bloqueo de los receptores mu y kappa produce ansiolisis (Filliol y cols, 2000; Knoll y cols, 2007).
- el **CRF**: desempeña un papel fundamental en la respuesta a estímulos estresantes. El estrés incrementa los niveles de CRF en el PVN, activando el eje HPA (*Ver Apartado 1.3.2.2*). Igualmente importante es la actividad de las neuronas que contienen CRF (Figura 2a) que se encuentran en la amígdala, donde estimulan la conducta del miedo en respuesta al estrés (Schulkin y cols, 2005), en la corteza cerebral, donde podría reducir la expectación hacia el refuerzo (Tsigos y Chrousos, 2002), y en el hipocampo, donde promueven el almacenamiento de la información contextual del estímulo estresante (Joëls, 2008). Debido a la importancia del CRF en las respuestas al estrés que están alteradas en los trastornos de la ansiedad, el sistema del CRF se ha convertido en una diana terapéutica para el tratamiento de estos desórdenes. Así, los antagonistas del receptor para CRF de tipo 1 producen ansiolisis en ensayos preclínicos con unos efectos secundarios mínimos, por lo que se hayan en fase II de desarrollo clínico (Zoumakis y cols, 2006).
- otros **neuropéptidos**: existen diversos péptidos ampliamente distribuidos por todo el cuerpo que se unen específicamente a receptores acoplados a proteínas G y que actúan como mensajeros en el sistema nervioso, bien modulando la actividad de los neurotransmisores clásicos, o ejerciendo un papel como factores de crecimiento (Holmes y cols, 2003). Numerosas evidencias indican que los neuropéptidos son particularmente importantes cuando el sistema nervioso es puesto a prueba por un estímulo estresante o dañino, como es el caso de un estímulo que genere ansiedad (Hökfelt y cols,

2003). Los neuropéptidos más destacados de entre los que han sido relacionados con la ansiedad son:

- **Sustancia P:** aunque el interés inicial sobre este neuropéptido se centró en el papel desarrollado en el dolor y la inflamación, se ha demostrado que la sustancia P modula también la actividad neuronal asociada a las manifestaciones de la ansiedad. La sustancia P produce efectos ansiogénicos potenciando la actividad serotoninérgica (Valentino y cols, 2003) y noradrenérgica (Guyenet y Aghajanian, 1977). En concordancia, el bloqueo farmacológico y genético de los receptores NK1 (Figura 2b), específicos para la sustancia P, produce una disminución de los niveles de ansiedad en estudios preclínicos (File, 2000; Santarelli y cols, 2002). Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos han demostrado una escasa eficacia de los antagonistas NK en el tratamiento de trastornos emocionales (Kramer y cols, 2004; Keller y cols, 2006).

- **Neuropéptido Y:** se encuentra densamente concentrado en el *locus coeruleus*, el PVN, el hipocampo y el núcleo del tracto solitario, aunque también se expresa en la amígdala, la corteza y el tálamo, todas ellas estructuras implicadas en los fenómenos de la ansiedad (Kask y cols, 2002) (Figura 2c). Existen evidencias tanto preclínicas como clínicas que indican que el neuropéptido Y tiene un efecto ansiolítico sobre la conducta y que podría participar en la capacidad de recuperación tras una situación de estrés elevado (Griebel, 1999; Morgan y cols, 2000). Esta función ansiolítica del neuropéptido Y podría deberse a la capacidad de inhibir las neuronas del *locus coeruleus* (Illes y cols, 1993) y de ejercer efectos funcionalmente opuestos al CRF (Kask y cols, 2002).

- **Galanina:** se expresa principalmente en el *locus coeruleus*, hipocampo y corteza (Figura 2d), ejerciendo un papel inhibitor de la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* y disminuyendo la liberación de noradrenalina en hipocampo y corteza (Hökfelt y cols, 1999). Se postula que el estrés produce un incremento en la expresión de galanina que permite amortiguar la sobreexcitación noradrenérgica inducida igualmente por el estrés. Si el estrés perdura en el tiempo puede producirse una excesiva expresión de galanina que potenciaría la autoinhibición del *locus coeruleus*, contribuyendo a la desregulación de

la actividad de la noradrenalina que se ha asociado a los trastornos de la ansiedad (Harro y Oreland, 2001).

- o **Colecistoquinina (CCK)**: se encuentra densamente localizada en la corteza cerebral, amígdala e hipocampo y está asociada a la transmisión GABAérgica. De hecho, GABA y CCK se expresan en las mismas neuronas en múltiples áreas cerebrales y la actividad de GABA inhibe tónicamente la liberación de CCK. Frente a una situación de estrés, se produce una liberación de CCK que se asocia a manifestaciones ansiogénicas (Harro, 2006). Por esta razón, las sustancias que bloquean la actividad de este péptido se han postulado como posibles ansiolíticos, aunque se encuentran todavía en fase experimental. Los escasos datos clínicos disponibles sobre la eficacia de los antagonistas CCK no han proporcionado resultados prometedores (Adams y cols, 1995; Pande y cols, 1999).

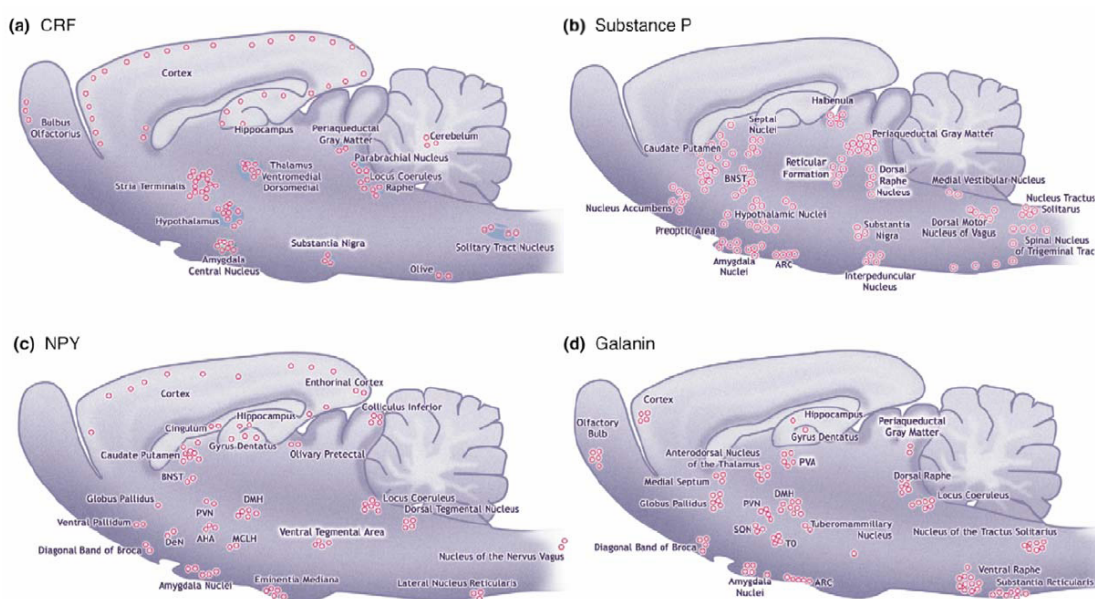


Figura 2. Los neuropéptidos (a) CRF, (b) Sustancia P, (c) Neuropéptido Y y (d) galanina se encuentran localizados en las áreas cerebrales relacionadas con el control de las emociones y la respuesta al estrés. Adaptado de Holmes y cols (2003).

1.2.3 Ansiedad asociada al consumo de sustancias

A diferencia de la mayor parte de trastornos de ansiedad, la ansiedad inducida por sustancias no está relacionada con la percepción de determinados estímulos estresantes. Es un tipo de ansiedad donde predominan las crisis de angustia o las obsesiones o compulsiones causadas por la intoxicación con determinadas sustancias o la abstinencia producida por el cese en el consumo de éstas (DMS-IV-

TR, American Psychiatric Association, 2005). Por orden de frecuencia, podemos enumerar las causas más comunes de los trastornos de ansiedad inducidos por sustancias:

- Ingesta excesiva de cafeína
- Drogas de abuso: nicotina, alcohol, cocaína, anfetaminas, éxtasis, marihuana y alucinógenos
- Abstinencia del alcohol, de benzodiazepinas y de nicotina
- Medicamentos: fenciclidina (o derivados), agonistas β -adrenérgicos, sedantes, hipnóticos

En el caso de las drogas de abuso, la asociación entre el consumo de sustancias y la ansiedad se puede establecer a dos niveles: el consumo de la sustancia como factor de riesgo de desarrollar un trastorno de ansiedad (causa) o como consecuencia de padecerlo (efecto). En la presente Tesis Doctoral hemos abordado el caso de la nicotina desde estos dos niveles (*Ver Capítulo 3*). Por un lado, se han evaluado los efectos ansiogénicos producidos por una dosis elevada de nicotina y los efectos disfóricos inducidos por la abstinencia de la nicotina (causa). Por otra parte, se ha evaluado la capacidad de la nicotina para aliviar los niveles de ansiedad producidos por la exposición a una situación estresante (efecto).

1.3 Neurobiología de la depresión

1.3.1 Introducción a la depresión

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DMS-IV-TR, American Psychiatric Association, 2005) permite distinguir, en función de los síntomas, los diferentes tipos de trastornos del estado de ánimo:

- *depresión mayor*: sentimiento de desesperanza, desvalorización, apatía, disminución de energía durante un periodo de tiempo prolongado e incluso pensamientos recurrentes sobre la muerte y el suicidio.
- *distimia*: estado de ánimo deprimido leve-moderado durante un período de tiempo prolongado (2 años o más) alternando con períodos breves de normalidad. Se caracteriza por la aparición de síntomas depresivos pero que no cumplen en conjunto los patrones diagnósticos de la depresión mayor.
- *trastornos bipolares o maníaco-depresivos*: alternancia de fases depresivas (desesperanza y pérdida de energía) y fases de gran euforia que, dependiendo de la intensidad de los síntomas, pueden considerarse

maníacas (optimismo exagerado e hiperactividad, con posibilidad de síntomas psicóticos) o hipomaníacas.

De entre todos ellos, la depresión mayor es la que presenta una mayor prevalencia en la población (Kessler y Wang, 2008). Se caracteriza por un estado de abatimiento e infelicidad que puede ser transitorio o permanente. La depresión es dos veces más frecuente en la población femenina que en la masculina y puede tener importantes consecuencias sociales y personales, desde la incapacidad laboral hasta el suicidio.

El principal criterio que establece el DSM-IV para el trastorno depresivo mayor es la presencia de por lo menos cinco de los síntomas siguientes:

- o Estado de ánimo triste, disfórico o irritable durante la mayor parte del día y durante la mayor parte de los días
- o Anhedonia o disminución de la capacidad para disfrutar o mostrar interés y/o placer en las actividades habituales
- o Disminución o aumento del peso o del apetito
- o Insomnio o hipersomnio
- o Enlentecimiento o agitación psicomotriz
- o Astenia (sensación de debilidad física)
- o Sentimientos recurrentes de inutilidad o culpa
- o Disminución de la capacidad intelectual
- o Pensamientos recurrentes de muerte o ideas suicidas

A pesar de la relevancia de la enfermedad y de haber sido el objeto de estudio de numerosos escritos y tratados médicos desde que Hipócrates en el S. V a.C. la describió por primera vez con el nombre de melancolía, el progreso en el conocimiento de la neurobiología de la depresión es todavía limitado. Se trata de una enfermedad muy heterogénea con un origen multifactorial, donde caben destacar factores desencadenantes como el estrés y la predisposición genética, aunque éstos no sean suficientes para explicar completamente la etiología de la enfermedad. El amplio espectro de síntomas de la depresión sugiere que existe una gran complejidad de sustratos neurobiológicos implicados en las manifestaciones depresivas. A raíz del conocimiento de la función de diversas áreas cerebrales en condiciones normales, se postula que áreas como el neocórtex y el hipocampo podrían estar relacionadas con los aspectos cognitivos de la depresión, mientras que el estriado y la amígdala lo estarían con la memoria emocional, la ansiedad y la anhedonia, y el hipotálamo con los síntomas neurovegetativos de la depresión (Nestler y cols, 2002a). La mayor parte del

conocimiento adquirido sobre la neuroquímica de la depresión proviene del descubrimiento casual en la década de los 50 del siglo pasado sobre las propiedades antidepresivas de algunos compuestos que modulan los niveles de monoaminas en el cerebro. Las evidencias acumuladas sobre la neurobiología de la depresión son revisadas en los apartados siguientes y se esquematizan en la Figura 3.

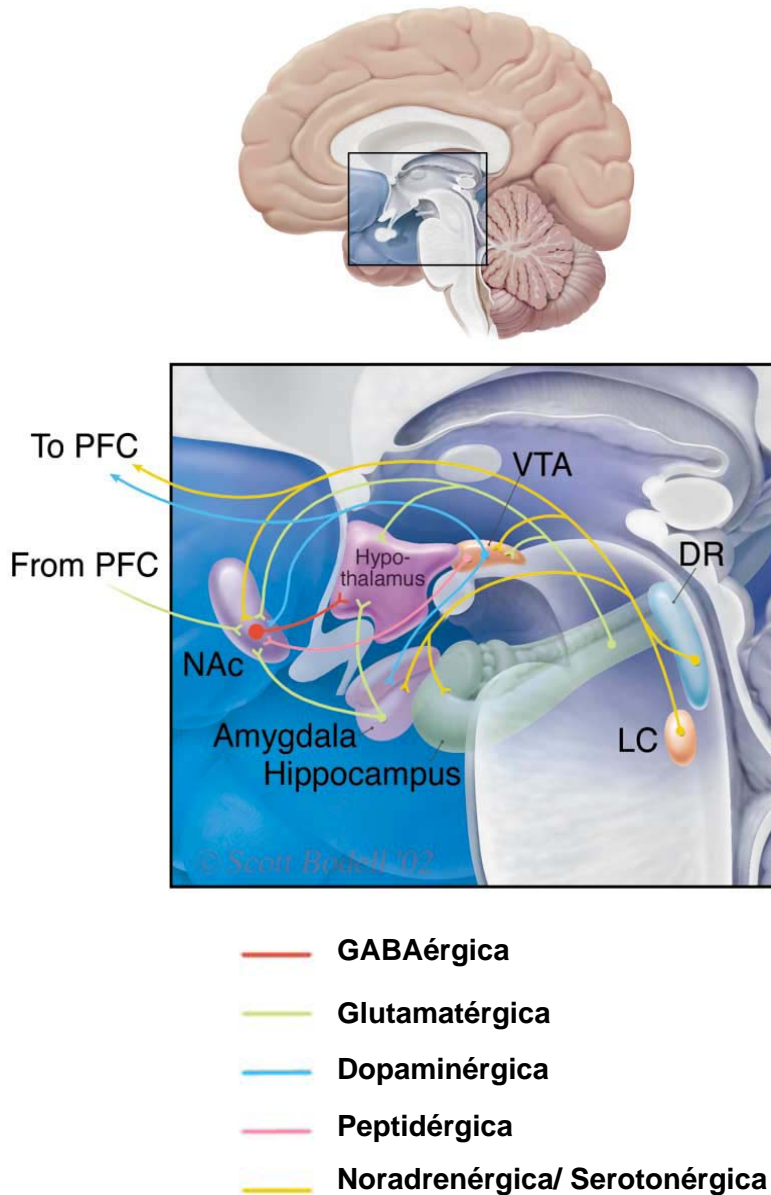


Figura 3. Sustratos neurobiológicos de la depresión. La figura muestra de manera simplificada los principales circuitos neuronales que pueden contribuir a los síntomas de la depresión. La mayor parte de la investigación se ha centrado en el hipocampo y la corteza frontal, pero existe un interés creciente sobre el papel desempeñado por las estructuras que participan en el refuerzo, la motivación y el control del miedo, como son el núcleo *accumbens* (NAc), la amígdala y el hipotálamo. Se muestran también las principales inervaciones que interconectan las diferentes áreas cerebrales implicadas. Adaptado de Nestler y cols (2002a).

1.3.2 Sustrato neurobiológico de la depresión

1.3.2.1 Sistema serotoninérgico e hipótesis monoaminérgica

1.3.2.1.1 Sistema serotoninérgico

La 5-HT es una monoamina sintetizada en las neuronas localizadas en los núcleos del rafe, que proyectan a múltiples regiones cerebrales (Figura 4). Participa en la regulación de fenómenos muy diversos, desde el ciclo circadiano y la ingesta hasta los procesos cognitivos y las emociones.

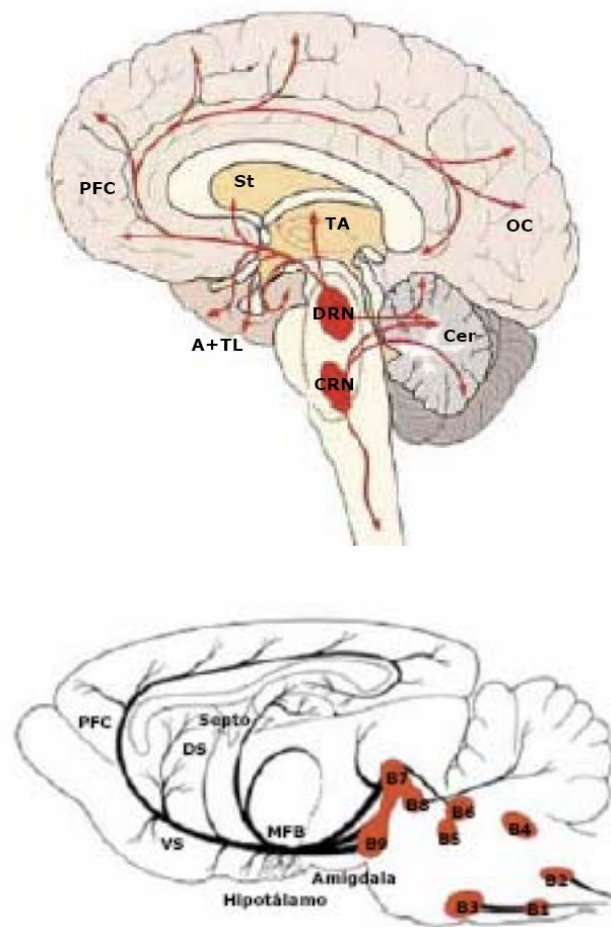


Figura 4. Corte sagital de cerebro humano (superior) y de roedor (inferior) representando las principales proyecciones serotoninérgicas. En el cerebro humano: CRN, núcleo del rafe caudal; DRN, núcleo del rafe dorsal; C, cerebelo; TA, tálamo; A, amígdala; TL, lóbulo temporal; ST, estriado; PFC, corteza prefrontal; OC, corteza occipital. En el cerebro de roedor: B7–B9, grupo de neuronas rostral; B1–3, grupo de neuronas caudal; B4–6, grupo de neuronas intermedio; B7, núcleo del rafe dorsal (DRN); B8, núcleo del rafe dorsal medial; MFB, haz medial del cerebro anterior; DS, estriado dorsal; VS, estriado ventral; PFC, corteza prefrontal. Adaptado de Cools y cols (2008).

La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido precursor triptófano por la acción de las enzimas hidroxilasa del triptófano y descarboxilasa del L-amino ácido aromático. Una vez sintetizada, es almacenada en vesículas presinápticas mediante la acción del transportador de monoaminas vesicular. La 5-HT es liberada al espacio sináptico, donde puede activar los receptores presinápticos y postsinápticos, ser recaptada por el transportador de 5-HT (5-HTT) presináptico o degradada por la oxidasa de monoaminas (Figura 5).

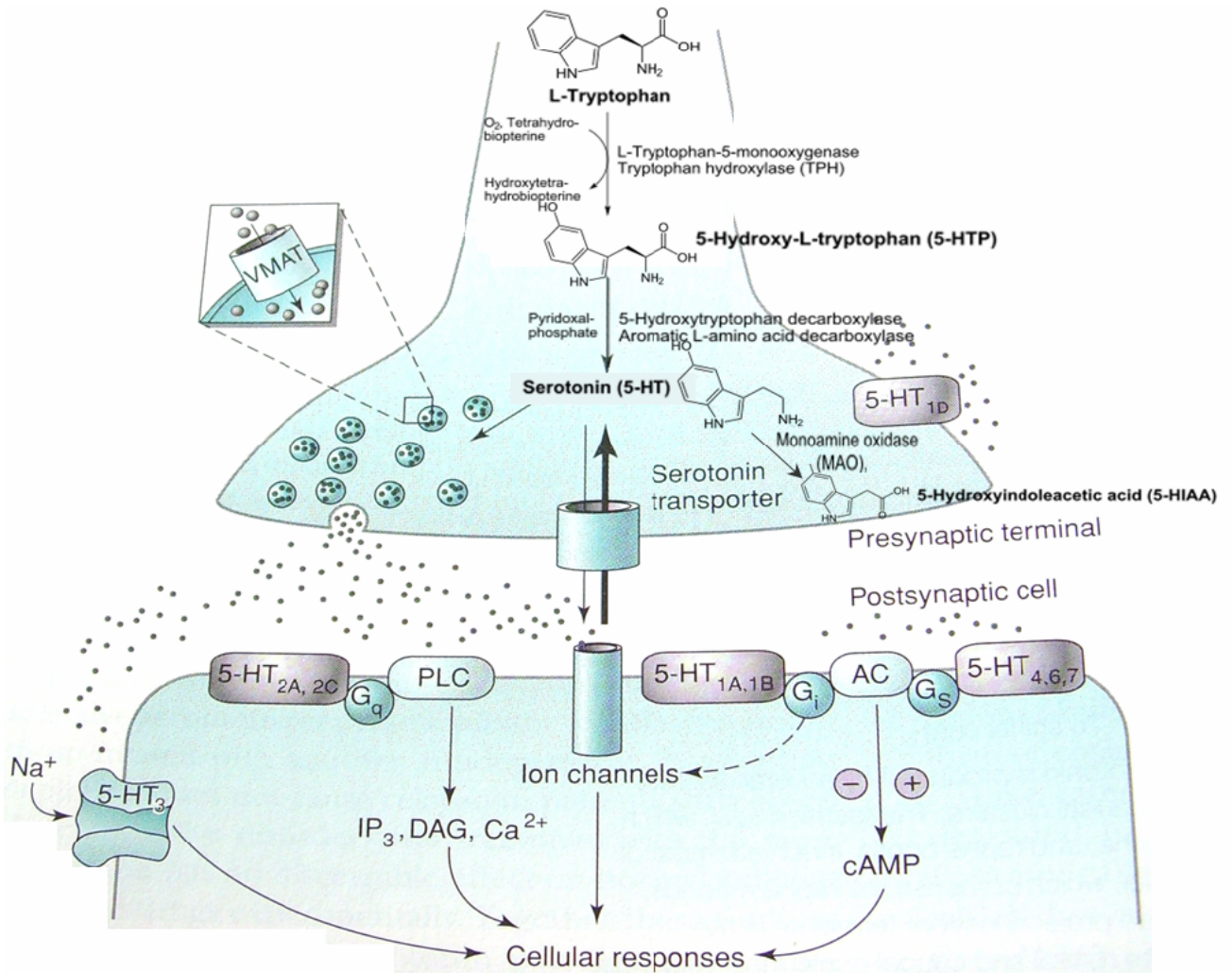


Figura 5. Modelo de una sinapsis serotoninérgica. Componentes pre y post sinápticos implicados en la síntesis, liberación, señalización, recaptación y degradación de la 5-HT. El triptófano es transportado a los terminales sinápticos, donde se inicia la síntesis de 5-HT. Una vez sintetizada y liberada, la 5-HT activa hasta 14 tipos diferentes de receptores, la mayoría de ellos postsinápticos, a excepción de los autorreceptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D/1B} que se hallan a nivel presináptico. El receptor 5-HT₃ es el único que no está acoplado a proteínas G y funciona como receptor ionóforo. VMAT, transportador vesicular de monoaminas; PLC, fosfolipasa C; AC, adenilato ciclasa; IP₃, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol. Adaptado de Nestler y cols (2001).

Se han identificado 14 tipos diferentes de receptores de 5-HT, todos ellos acoplados a proteínas G excepto el receptor 5-HT₃, que es un receptor ionóforo (Nichols y Nichols, 2008). En general, los receptores 5-HT₁ están acoplados a proteínas de tipo G_i, los receptores 5-HT₂ a proteínas de tipo G_q y los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ a proteínas de tipo G_s, mediante las cuales se desencadenan las cascadas de señalización asociadas a los efectos producidos por la 5-HT (Figura 5). No se conoce, en cambio, acoplamiento para el receptor 5-HT₅.

Además de desencadenar la señalización asociada a la 5-HT, los receptores de 5-HT tienen la capacidad de modular la propia actividad serotoninérgica. De entre todos ellos, el 5-HT_{1A} y el 5-HT_{1D/B} son los únicos que se encuentran a nivel presináptico y que participan en esta regulación directa de la actividad serotoninérgica (Figura 6). El autorreceptor 5-HT_{1A} se encuentra en el soma de las neuronas serotoninérgicas y su activación es capaz de inhibir la actividad eléctrica de las propias neuronas. La activación del receptor axonal 5-HT_{1D} (5-HT_{1B} es el homólogo en roedores), disminuye también la actividad serotoninérgica pero en este caso reduciendo la síntesis y liberación de 5-HT (Barnes y Sharp, 1999). En cambio, la inhibición de las neuronas serotoninérgicas mediada por la actividad de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} se produce de manera indirecta. Estos receptores están situados en neuronas no serotoninérgicas que modulan la actividad de 5-HT a través de proyecciones GABAérgicas o glutamatérgicas desde la corteza prefrontal o la habénula lateral (LHb) sobre el núcleo del rafe (Sharp y cols, 2007) (Figura 6).

Aparte de los receptores de 5-HT, otro componente serotoninérgico que desempeña un papel fundamental en la transmisión de la 5-HT es el 5-HTT. El 5-HTT participa en la finalización de la transmisión sináptica serotoninérgica, determinando la amplitud y duración de la misma, y numerosas evidencias apuntan hacia un papel fundamental del 5-HTT como controlador de la regulación de las emociones (Lesch y Mössner, 2006).

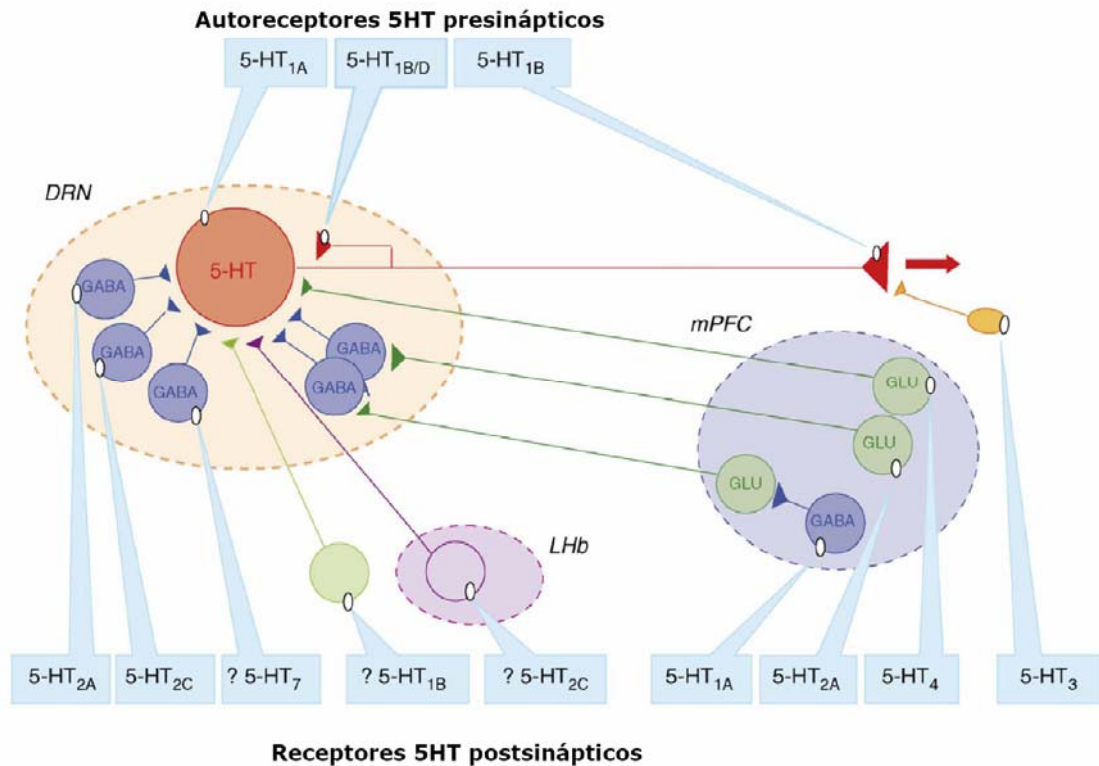


Figura 6. Diagrama que resume la localización teórica de los autorreceptores y receptores postsinápticos de 5-HT y su implicación en el mecanismo de regulación de la actividad de las neuronas serotoninérgicas en el cerebro. Adaptado de Sharp y cols (2007).

1.3.2.1.2 Hipótesis monoaminérgica

En la década de los 50 del siglo pasado se descubrieron de forma casual las propiedades antidepresivas de dos tipos de sustancias: los compuestos tricíclicos y los inhibidores de la enzima monoamina-oxidasa (IMAO). Los primeros derivaban de las fenotiazinas y surgieron de la investigación de nuevas sustancias antihistamínicas y sedativas. Se observó que estas sustancias tricíclicas eran capaces de elevar los niveles extracelulares de 5-HT y de noradrenalina inhibiendo su recaptación. Los IMAO, en cambio, se identificaron a partir del desarrollo de fármacos antituberculosos y se observó que eran capaces de inhibir la enzima crítica en el metabolismo de las monoaminas. En base a las evidencias que demostraban que ambos antidepresivos eran capaces de potenciar o prolongar las acciones de las monoaminas, se postuló la hipótesis monoaminérgica de la depresión. Esta hipótesis propone que una reducción de la actividad monoaminérgica induciría una regulación al alza de los receptores de estos neurotransmisores en diferentes estructuras cerebrales y que estas alteraciones podrían ser la causa del desarrollo de la depresión. Así, la facilitación de la neurotransmisión monoaminérgica sería clave en la acción de los antidepresivos

(Schildkraut, 1965). En la Tabla 1 se resumen las principales evidencias que sustentan la hipótesis monoaminérgica de la depresión.

Tabla 1. Principales evidencias que implican una alteración en las vías monoaminérgicas en la patofisiología de la depresión y que sustentan la hipótesis monoaminérgica de la depresión. Adaptado de Garlow y Nemeroff (2004).

Nivel de acción	Evidencia	Replicabilidad
Disponibilidad del precursor	Niveles de TRP disminuidos en pacientes deprimidos	+/-
	La depleción de TRP induce una recaída en pacientes tratados con antidepresivos	++
	La depleción del TRP induce disforia en familiares de primer grado de pacientes deprimidos	++
Síntesis del neurotransmisor	El PCPA, inhibidor de la hidroxilasa de TRP, induce una recaída en pacientes tratados con antidepresivos	+
Almacenamiento del neurotransmisor	El tratamiento con reserpina, que depleciona el almacenamiento de las MA, induce síntomas depresivos en pacientes con historial depresivo	++
Liberación del neurotransmisor	La fenfluramina y la MDMA, que incrementan la 5HT sináptica, causan moderada euforia y sensación de bienestar	+
	El litio, que incrementa la liberación de 5HT, aumenta la acción de los antidepresivos	+++
	Liberación de prolactina en respuesta al TRP disminuida en pacientes deprimidos	++
	Liberación de prolactina en respuesta a la fenfluramina disminuida en pacientes deprimidos	+++
	Utilización de glucosa cerebral en respuesta a la fenfluramina disminuida en pacientes deprimidos	+
	Liberación de prolactina en respuesta al citalopram disminuida	+
Autoreceptores presinápticos	Los agonistas 5HT _{1A} pueden tener propiedades antidepresivas	++
Recaptación del neurotransmisor	Los inhibidores de la recaptación de 5HT son antidepresivos efectivos	+++
	Disminución de los sitios de recaptación de 5HT en las plaquetas de pacientes deprimidos	+++
	Disminución de los sitios de recaptación de 5HT en cerebros postmortem de pacientes deprimidos	+/-
	Sitios de recaptación de 5HT regulados a la baja en respuesta a los antidepresivos (pacientes)	+/-
	Sitios de recaptación de 5HT regulados a la baja en respuesta a los antidepresivos (animales de experimentación)	++
Metabolismo del neurotransmisor	Los IMAOs son antidepresivos efectivos	+++
	Niveles de metabolitos de 5HT bajos en pacientes deprimidos	+/-
	Niveles de metabolitos de 5HT bajos en pacientes con tendencia al suicidio	+++
Receptores postsinápticos	Receptor 5HT _{1A}	
	Incremento de la B _{max} en cerebros de suicidas	+/-
	Receptor 5HT _{1D}	
	Respuesta disminuida de la GH al sumatriptan-zolmitriptan	++
	Receptor 5HT ₂	
	Incremento de la B _{max} en cerebros de suicidas	++/-
	Incremento de la B _{max} en las plaquetas de pacientes deprimidos	+++
Antagonistas son antidepresivos	+++	
Regulación a la baja en respuesta a antidepresivos (pacientes)	+	
Regulación a la baja en modelos animales de experimentación	+++	

Abreviaturas: GH: hormona de crecimiento; MDMA: 3,4 = metilendioximetamfetamina; PCPA: paraclorofenilalanina; TRP: triptófano

Replicabilidad: + = sin réplica; ++ = varias réplicas; +++ = altamente replicado; +/- = resultados inconsistentes

Durante décadas, la hipótesis monoaminérgica ha dominado el desarrollo de nuevos fármacos antidepresivos, con un resultado relativamente exitoso ya que ha permitido la aparición de nuevos fármacos con menos efectos secundarios que los tricíclicos o los IMAO, como son los inhibidores de la recaptación de la 5-HT o los inhibidores duales de la 5-HT y noradrenalina, que han sido ampliamente

utilizados en psiquiatría. No obstante, la hipótesis monoaminérgica merece una serie de consideraciones. En primer lugar, aunque la facilitación de la neurotransmisión monoaminérgica es el mecanismo de acción inmediato de los antidepresivos clásicos, ésta no puede mediar *per se* las acciones terapéuticas puesto que los efectos clínicos aparecen tras una exposición continuada al fármaco durante al menos dos o tres semanas. Este periodo de tiempo desde el efecto inicial sobre las monoaminas hasta la eficacia clínica sugiere que las acciones agudas de estos fármacos inducen y mantienen una serie de adaptaciones específicas en el cerebro que en último término son las responsables de la eficacia clínica (Heninger y cols, 1996). En segundo lugar, existen muy pocas evidencias que relacionen anomalías primarias en las vías monoaminérgicas del cerebro como causa de los síntomas depresivos (Charney, 1998). Además, la modulación de las vías monoaminérgicas ejerce efectos paliativos en diversos mecanismos fisiopatológicos, como los trastornos de pánico, los desórdenes obsesivos-compulsivos o el dolor crónico, indicando que la implicación de las vías monoaminérgicas no es específica de la depresión. Por último, no todos los compuestos que facilitan a transmisión monoaminérgica son antidepresivos efectivos, como es el caso los psicoestimulantes y otros facilitadores de la acción de las monoaminas.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones y el hecho de que los actuales tratamientos son efectivos tan sólo en un 50% de los pacientes (Walsh y cols, 2002), se han postulado recientemente nuevas hipótesis sobre la depresión que van más allá de las monoaminas, partiendo del conocimiento que se ha ido adquiriendo sobre los mecanismos de acción de los antidepresivos (Berton y Nestler, 2006). Estas hipótesis proponen la desregulación de la respuesta al estrés, alteraciones en la plasticidad neuronal y modificaciones de los circuitos de recompensa y motivación como mecanismos claves en la neurobiología de la depresión, y aportan un punto de vista más amplio para el desarrollo de nuevas terapias para la depresión. Desde esta nueva perspectiva, las monoaminas son consideradas como elementos moduladores de otros sistemas neurobiológicos que pueden tener una relación más primaria con la depresión (Heninger y cols, 1996).

1.3.2.2 Estrés y control del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA)

Aunque el estrés *per se* no es suficiente para inducir una depresión, se ha demostrado que la exposición a situaciones de estrés intenso o prolongado puede ser la causa de la aparición de cuadros depresivos en individuos susceptibles (Kendler y cols, 1999). De hecho, aproximadamente la mitad de los individuos deprimidos presentan una excesiva activación del eje HPA, que puede ser

corregida con un tratamiento con antidepresivos (Holsboer, 2001). Además, en modelos animales la exposición crónica al estrés induce un estado que reproduce algunos de los rasgos clínicos más relevantes de la depresión (Willner, 2005), como se describe en el *Apartado 1.4.2*. Por tanto, a pesar de que no se conocen todos los detalles de la interacción, existen evidencias claras sobre la implicación del estrés en la etiología de la depresión.

Cuando el organismo es expuesto a un estrés, diversos mecanismos se activan con el objetivo de restablecer la homeostasis. El mecanismo más relevante por el cual el cerebro reacciona frente a una situación de estrés es la activación del eje HPA (Figura 7). Ante esta situación, las neuronas del PVN que contienen el factor liberador de corticotrofina (CRF) secretan este factor, que en la pituitaria anterior estimula la síntesis y liberación al torrente sanguíneo de la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La ACTH a su vez estimula en la corteza adrenal la síntesis y liberación de glucocorticoides, el principal de los cuales es el cortisol en humanos y la corticosterona en roedores. Estas hormonas, los glucocorticoides, ejercen numerosas acciones a nivel periférico y a nivel del sistema nervioso central. A nivel periférico, los glucocorticoides están implicados en la movilización energética (glucogenolisis), en la modulación de la respuesta inmune y en la regulación del sistema cardiovascular. A nivel central, los glucocorticoides ejercen importantes funciones fisiológicas en el control del ciclo circadiano y en las respuestas a las situaciones estresantes. La actividad del eje HPA está controlada por diversos circuitos cerebrales, incluyendo el hipocampo, que ejerce una influencia inhibitoria sobre las neuronas del PVN que contienen CRF, y la amígdala, que ejerce una influencia excitatoria (Figura 7). Los glucocorticoides son capaces de producir un potente control inhibitorio sobre la propia actividad del eje HPA regulando la acción de las neuronas del hipocampo y del PVN, generando así un mecanismo de retroalimentación que favorece la homeostasis.

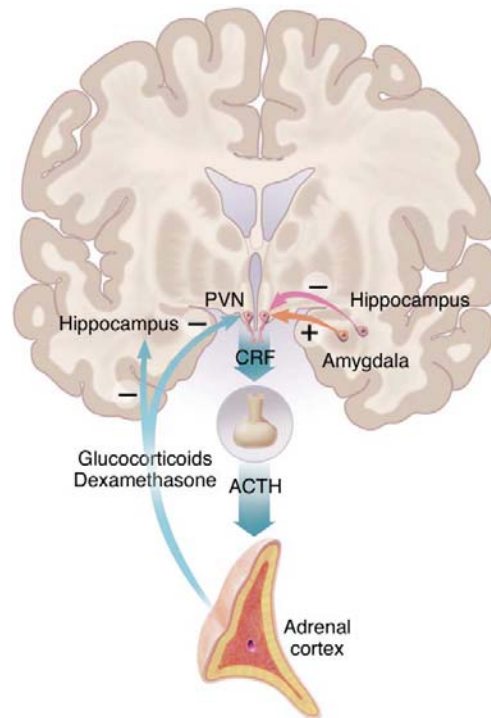


Figura 7. Regulación del eje HPA. Las neuronas del PVN que contienen CRF integran información relevante para el estrés. Los principales mecanismos neuronales que participan en su regulación incluyen aferencias excitatorias de la amígdala y aferencias inhibitorias del hipocampo. El CRF es secretado por las neuronas del PVN y activa la pituitaria anterior que libera ACTH en el torrente sanguíneo. La ACTH en la corteza adrenal estimula la liberación de glucocorticoides. Entre sus numerosas funciones, los glucocorticoides inhiben la síntesis y liberación de CRF y ACTH. De esta manera, los glucocorticoides inhiben su propia síntesis. Adaptado de Nestler y cols (2002a).

Los glucocorticoides actúan a través de la unión a dos tipos de receptores citoplasmáticos: los mineralocorticoides (MR) o de tipo I, y los glucocorticoides (GR) o de tipo II. Estos receptores se expresan abundantemente en las estructuras límbicas, donde median acciones distintas y complementarias (de Kloet y cols, 1998). La afinidad de los GR por los glucocorticoides es 10 veces menor que la de los MR, de manera que en condiciones fisiológicas los MR están prácticamente ocupados por los glucocorticoides circulantes, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis, mientras que en esas condiciones basales tan sólo un 10% de los GR se halla ocupado. Esta baja ocupación de los GR se invierte cuando existe una elevación súbita de los niveles de glucocorticoides debida a un pico del ciclo circadiano o a una situación de estrés. Debido a esta distinta ocupación de MR y GR, se ha propuesto una función diferenciada para estos dos receptores, con una actividad tónica inhibitoria del MR y una función del GR en la retroalimentación negativa del eje HPA durante el estrés o en un pico circadiano (de Kloet y cols, 1998). Recientemente, el descubrimiento de unos MR de membrana con menor afinidad por los glucocorticoides que los MR citoplasmáticos ha llevado a formular la hipótesis de que los MR participarían también en las fases

más tempranas de la respuesta al estrés (Joëls y cols, 2008). Los glucocorticoides ejercen su acción a través de los receptores GR y MR por dos vías distintas. La más estudiada de estas vías es la genómica, que implica la translocación de los receptores al núcleo donde modifican la transcripción de diversos genes y que por tanto participa en las respuestas al estrés más lentas (Datson y cols, 2008). La otra vía por la que actúan los glucocorticoides es la no genómica, que desencadena las respuestas inmediatas al estrés mediante la activación de vías de señalización intracelular y mediante la alteración de componentes de la membrana neuronal (Haller y cols, 2008).

Una de las estructuras cerebrales donde existe mayor densidad de receptores MR y GR es el hipocampo, hecho que le confiere una relevancia importante como modulador de la respuesta al estrés y como diana de los efectos adaptativos inducidos por el estrés. Los glucocorticoides liberados tras un estrés agudo incrementan de manera inmediata la excitabilidad de las neuronas hipocampales facilitando la potenciación a largo plazo (LTP) en el área CA1, que es uno de los sustratos neurobiológicos más importantes para el aprendizaje y la formación de la memoria (Wiegert y cols, 2006). A su vez, los glucocorticoides inician una serie de eventos por vía genómica que producen efectos conductuales al cabo de unas horas de la exposición al estrés y comportan un restablecimiento de la actividad normal y una preservación de la información que se ha adquirido durante la situación de estrés (Figura 8). De esta manera, el organismo está óptimamente preparado para afrontar una situación de estrés similar en el futuro (Joëls, 2008).

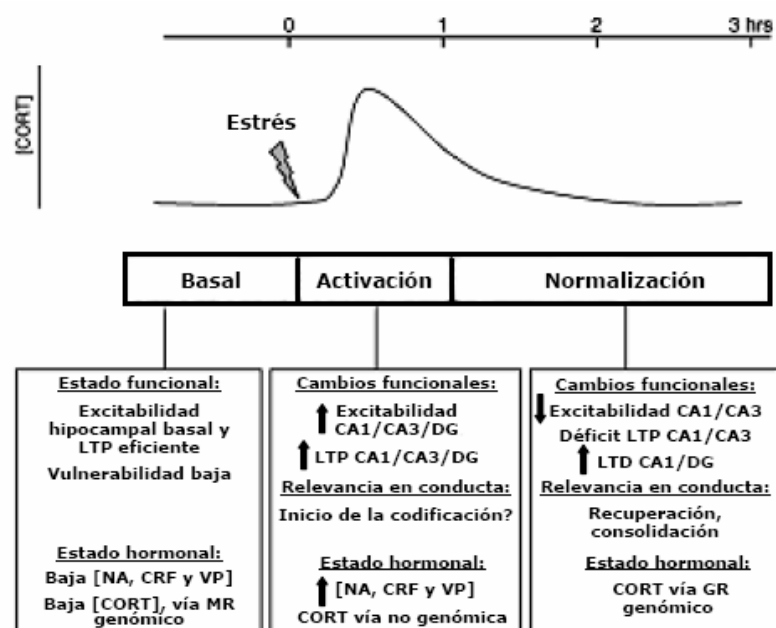


Figura 8. Representación esquemática de la excitabilidad del hipocampo durante las diversas fases de la exposición a un estrés agudo. Adaptado de Joëls (2008).

En cambio, la exposición crónica a elevadas concentraciones de glucocorticoides, puede alterar la función de las neuronas hipocampales. La actividad tónica de los receptores MR deja de ser predominante puesto que los receptores GR están constantemente activados y esto comporta una desregulación de la inducción de LTP por un exceso en la excitabilidad glutamatérgica, que puede conducir a una deficiencia cognitiva como la que se relaciona en ocasiones con la depresión (Joëls, 2008). Aparte de las alteraciones inducidas sobre la excitabilidad de las neuronas hipocampales, la exposición crónica al estrés puede producir una deficiencia en la neuroplasticidad del hipocampo reduciendo la arborización de las dendritas y la neurogénesis, comprometiendo por tanto la actividad hipocampal (Sapolsky, 2003). De esta manera, la función inhibitoria del hipocampo sobre el HPA puede reducirse, induciendo un incremento en los niveles circulantes de glucocorticoides que pueden resultar en un daño adicional sobre el hipocampo, produciéndose así una retroalimentación positiva con consecuencias patológicas. Esta alteración de la plasticidad neuronal puede ser remitida por la acción de los antidepresivos (Pittenger y Duman, 2007).

Las alteraciones del eje HPA y los trastornos de tipo depresivo no parecen estar únicamente relacionadas por el hipercortisolismo asociado al estrés crónico, sino que también juega un papel importante el incremento en la actividad del CRF, que es un elemento crítico en la memoria emocional y en la percepción de los estímulos aversivos o reforzantes. De hecho, los receptores de CRF están siendo investigados como posibles dianas terapéuticas para tratar los desórdenes emocionales puesto que los antagonistas de estos receptores presentan un potencial antidepresivo (Holsboer y Ising, 2008).

1.3.2.3 Plasticidad neuronal

La plasticidad neuronal es la capacidad del sistema nervioso de remodelar los contactos entre neuronas y la eficiencia de las sinapsis, propiedad que le confiere la posibilidad de adaptarse a diferentes situaciones. Se ha asociado la depresión con una deficiencia en la plasticidad neuronal tanto a nivel de la morfología de las dendritas como a nivel de la supervivencia y viabilidad de las células (Pittenger y Duman, 2008).

1.3.2.3.1 Hipótesis neurotrófica

Los factores neurotróficos son potentes reguladores de la plasticidad y la supervivencia de las neuronas adultas y de la glía, además de desempeñar un papel fundamental en el crecimiento y diferenciación neuronal durante las etapas de desarrollo embrionario (Huang y Reichardt, 2001). De entre los diferentes

factores neurotróficos, uno de los más abundantes en el cerebro es el BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), que promueve la plasticidad neuronal activando la vía de señalización asociada al receptor específico TrkB (Kaplan y Miller, 2000). El BDNF es el factor neurotrófico sobre el que más evidencias existen de la relación entre la deficiencia en la plasticidad neuronal inducida por la exposición al estrés y el desarrollo de la depresión (Duman y Monteggia, 2006). El estrés crónico o severo reduce los niveles de BDNF en el hipocampo (Smith y cols, 1995) y la arborización de las dendritas (Sapolsky, 2003). Una disminución similar en los niveles de BDNF se ha observado en el hipocampo de individuos deprimidos suicidas (Dwivedi y cols, 2003). Los antidepresivos son capaces de revertir el efecto del estrés sobre el BDNF e incluso incrementar su expresión, promoviendo así la normalización de la plasticidad neuronal, tanto en modelos animales (Dwivedi y cols, 2006) como en pacientes deprimidos (Chen y cols, 2001).

Estas observaciones han contribuido a postular la hipótesis neurotrófica de la depresión (Figura 9), que plantea que una deficiencia en el aporte de factores neurotróficos contribuiría a una patología hipocampal durante el desarrollo de la depresión y que la reversión de esa deficiencia mediante el tratamiento con antidepresivos sería crucial en la mejora de la sintomatología depresiva (Duman y Monteggia, 2006).

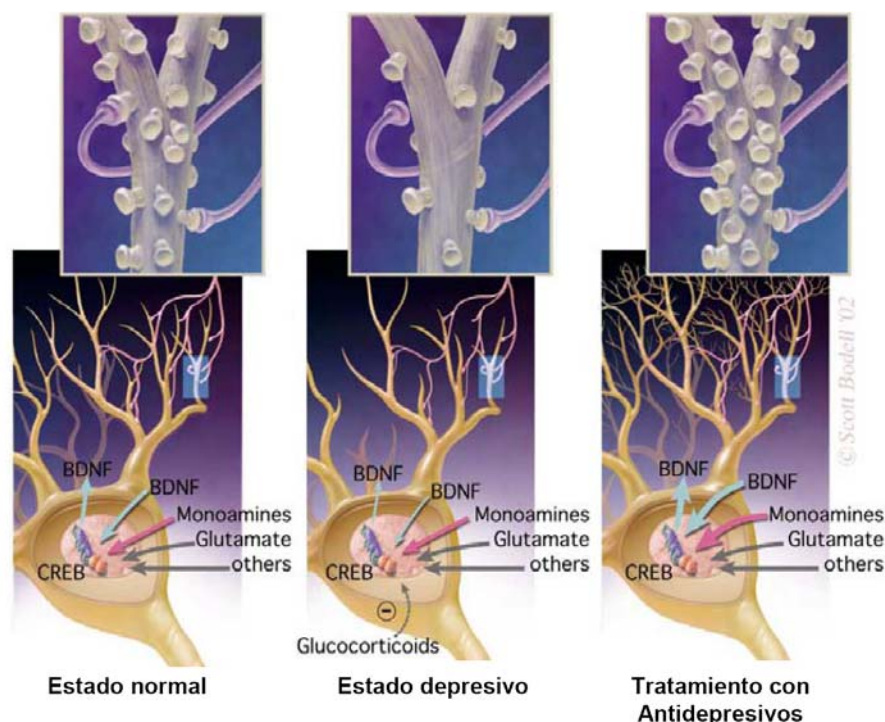


Figura 9. Hipótesis neurotrófica de la depresión. La exposición a un estrés severo o crónico produce una reducción de la arborización dendrítica respecto a con una situación normal (panel izquierdo), que puede estar relacionada con una deficiencia en el aporte de BDNF y con la aparición de un estado depresivo (panel central). El tratamiento con antidepresivos revierte esta situación, promoviendo la arborización dendrítica y la expresión de BDNF (panel derecha). Éste último efecto podría estar mediado por la activación del factor de transcripción CREB. Adaptado de Nestler y cols (2002a).

La acción de los antidepresivos sobre la expresión de BDNF está modulada, al menos parcialmente, por la actividad del factor de transcripción CREB (Conti y cols, 2002). CREB es un elemento integrador común de las vías de señalización de numerosos estímulos extracelulares que influyen sobre la plasticidad y la supervivencia neuronal, de manera que el incremento en la actividad de CREB inducido por los antidepresivos podría modular numerosas vías relacionadas con la plasticidad neuronal más allá del BDNF (Carlezon y cols, 2005). De esta manera, existen numerosas dianas moleculares por las que se podría incrementar la plasticidad y supervivencia neuronal en los trastornos emocionales modulando la actividad de CREB (Figura 10).

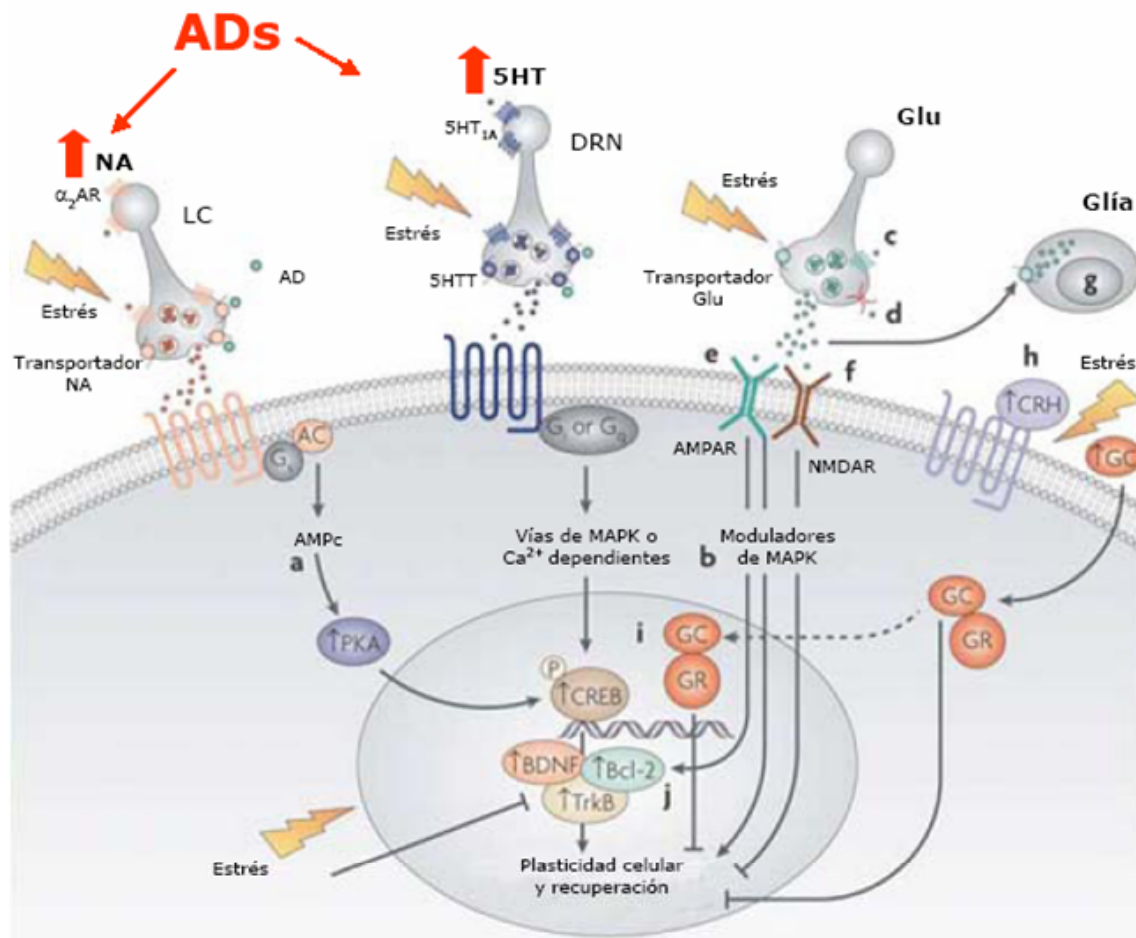


Figura 10. Principales vías de señalización implicadas en la neuroplasticidad y afectadas por el estrés, la depresión y el tratamiento con antidepresivos (ADs) que confluyen en CREB. La figura muestra alguna de las dianas por las que se podría modular la actividad de CREB para mejorar la plasticidad y supervivencia neuronal en los trastornos emocionales: (a) inhibidores de fosodiesterasas; (b) moduladores de las MAPKinasas; (c) agonistas mGluR II/III; (d) sustancias que atenúan la liberación de glutamato (Glu); (e) potenciadores de AMPA; (f) antagonistas de NMDA; (g) sustancias que potencian la liberación de factores tróficos y la retirada de los excesos de glutamato mediados por la glía; (h) antagonistas del CRF y (i) de los glucocorticoides; (j) sustancias que regulan al alza Bcl-2. Adaptado de Mathew y cols (2008).

A pesar de que la hipótesis neurotrófica de la depresión unifica evidencias clínicas y preclínicas sobre el vínculo entre el estrés y el desarrollo de los trastornos depresivos, esta hipótesis tiene una importante limitación ya que las alteraciones de la neuroplasticidad en determinadas áreas cerebrales implicadas en la depresión pueden tener efectos opuestos a los descritos en el hipocampo. Por ejemplo, un incremento en la expresión de BDNF en la vía dopaminérgica mesolímbica produce un efecto pro-depresivo (Berton y cols, 2006). De manera similar, la neuroplasticidad en la amígdala parece ir en sentido opuesto al propuesto hipotéticamente. El estrés crónico y los glucocorticoides incrementarían la arborización dendrítica y la conectividad neuronal en la amígdala y contribuirían al desarrollo de un estado depresivo (Vyas y cols, 2002). Por tanto, es necesario profundizar más en el conocimiento de estos fenómenos para caracterizar completamente los efectos globales de la activación de las vías asociadas con la neuroplasticidad con el fin de plantear posibles dianas terapéuticas.

1.3.2.3.2 Neurotoxicidad y neurogénesis

Aparte de la remodelación dendrítica y la conectividad de las neuronas, otros importantes aspectos de la plasticidad neuronal que resultan relevantes en el desarrollo de la depresión son la supervivencia neuronal y la capacidad de neurogénesis en el hipocampo. Por un lado, esta estructura es una de las más sensibles a la pérdida neuronal debida a la exposición a diferentes situaciones neurotóxicas como los infartos, la hipoxia-isquemia o la hipoglucemia. La exposición excesiva a los glucocorticoides induce también neurotoxicidad, bien de manera directa o bien potenciando los efectos neurotóxicos de otros insultos (Sapolsky, 2000). De esta manera, el estrés excesivo podría asociarse con la neurodegeneración hipocampal descrita en pacientes deprimidos que presentan una reducción del volumen de esta estructura (Bremner y cols, 2000), tanto por la reducción de la arborización dendrítica como por la muerte neuronal que produce. Por otro lado, la región del giro dentado del hipocampo es una de las dos únicas estructuras del cerebro adulto, junto con la zona subventricular, en las que se produce neurogénesis (Ming y Song, 2005). La función específica y la relevancia de estas nuevas neuronas generadas sigue sin estar completamente establecida, aunque existen evidencias de que puedan desempeñar un papel relevante en el aprendizaje (Leuner y cols, 2006) y en la patofisiología y tratamiento de los trastornos depresivos (Warner-Schmidt y Duman, 2006). El hecho de que los factores tróficos sean imprescindibles en este proceso de generación de nuevas neuronas (Sairanen y cols, 2005) y que el estrés sea uno de los principales reguladores negativos de la neurogénesis apoyan esta última hipótesis. La

exposición a un estrés severo o repetido induce un rápido y prolongado descenso en la tasa de proliferación celular que es revertido por el tratamiento crónico con antidepresivos (Warner-Schmidt y Duman, 2006). Asimismo, se ha demostrado que la neurogénesis es necesaria para que los antidepresivos sean efectivos en diferentes modelos animales de depresión (Santarelli y cols, 2003). Una esquematización sobre el fenómeno de la neurogénesis y la implicación de los factores tróficos y los antidepresivos en este proceso puede verse en la Figura 11.

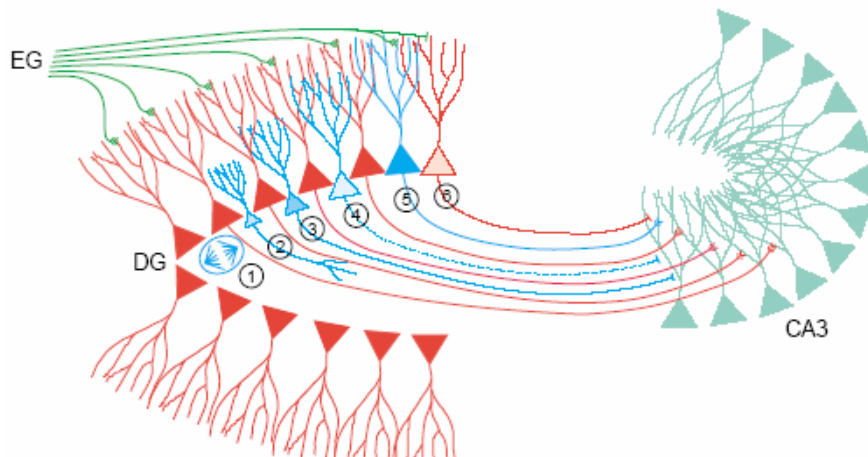


Figura 11. Modelo neurotrófico para la diferenciación de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo y los efectos de los antidepresivos sobre este proceso. 1) Los precusores neurales proliferan en el giro dentado (DG), proceso que es inhibido por el estrés y estimulado por los antidepresivos. 2) Las nuevas neuronas se diferencian y extienden un axón hacia la región CA3. 3) Cuando las nuevas neuronas alcanzan esta región forman una sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de CA3, proceso dependiente de factores neurotróficos liberados de forma dependiente de la actividad de estas neuronas piramidales. 4) Las neuronas que no logran formar una sinapsis activa son eliminadas por apoptosis. 5) Las neuronas que consiguen conectar las proyecciones provenientes de la corteza entorrinal (EC) con las neuronas de CA3 sobreviven como parte integrante de la red neuronal del hipocampo. 6) Las neuronas granulares preexistentes que pierden la competencia por la transmisión sináptica son eliminadas. Existen evidencias de los efectos de los antidepresivos sobre estos procesos a todos los niveles excepto en las fases 2 y 3. Adaptado de Castrén (2004).

Teniendo en cuenta las evidencias reseñadas, podemos concluir que existe una convergencia entre las consecuencias de la exposición crónica al estrés, las alteraciones de la neuroplasticidad (morfología, neurotoxicidad y neurogénesis) y los mecanismos de acción de los antidepresivos.

1.3.2.4 Motivación y circuitos de recompensa

La mayor parte de la investigación realizada sobre el sustrato neuroanatómico de la depresión se ha centrado en el papel desarrollado por el hipocampo y la corteza frontal en las deficiencias cognitivas asociadas a este trastorno y al control de las

emociones. Sin embargo, dada la importancia de la anhedonia, o disminución de la motivación, que presentan la mayoría de los individuos deprimidos, parece evidente que las regiones cerebrales que modulan la motivación y los circuitos de recompensa puedan participar igualmente en la patofisiología de la depresión (Nestler y Carlezon, 2006).

A partir de estudios realizados dentro del campo de investigación de la adicción a las drogas, se ha podido identificar el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico como un sustrato esencial para la recompensa y la motivación de las drogas así como de los estímulos naturales como la comida, el sexo o las interacciones sociales (Camí y Farré, 2003). El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico tiene como origen el área tegmental ventral (VTA) e incluye tanto las proyecciones desde este núcleo hacia estructuras límbicas como el núcleo *accumbens* y la amígdala y hacia la corteza prefrontal, como las proyecciones de diferente naturaleza que modulan estas vías (Figura 12).

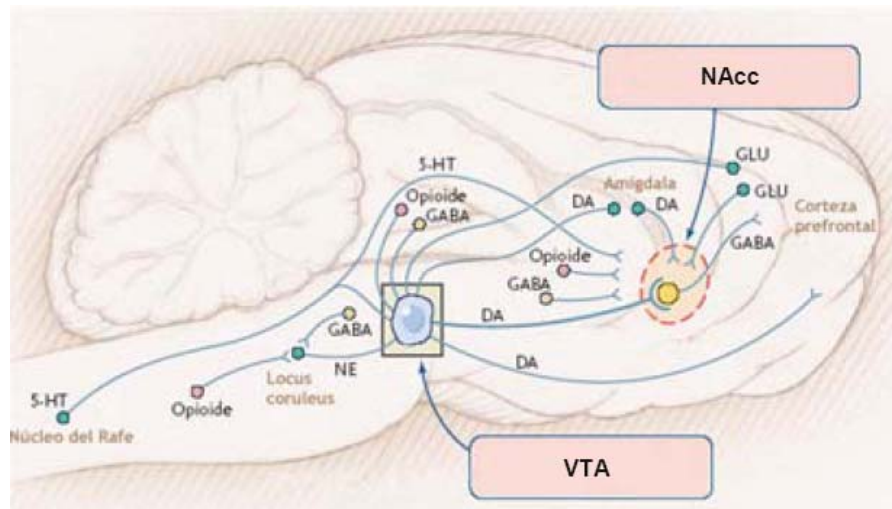


Figura 12. El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Se origina en el VTA y proyecta hacia estructuras límbicas como el núcleo *accumbens* (NAcc) y la amígdala y hacia la corteza prefrontal. La actividad de esta vía está regulada por las proyecciones provenientes del núcleo del rafe, del *locus coeruleus*, de la corteza prefrontal y de la amígdala, así como por otras interneuronas de diferente naturaleza. Adaptado de Camí y Farré (2003).

La exposición al estrés induce una potente activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA que supone la estimulación del núcleo *accumbens*. Se postula que esta estimulación del VTA inducida por el estrés representa un mecanismo positivo para potenciar la motivación del individuo para hacer frente a la situación estresante. Sin embargo, el estrés crónico puede causar adaptaciones a largo plazo en la vía VTA-núcleo *accumbens* con consecuencias patológicas asociadas a la depresión. De hecho, la manipulación de la vía VTA-núcleo

accumbens puede modificar la conducta de tipo depresivo en algunos modelos animales (Nestler y Carlezon, 2006).

Uno de los elementos clave en las adaptaciones de la vía VTA-núcleo *accumbens* que se han descrito es el factor de transcripción CREB. El estrés o las drogas de abuso estimulan la actividad de CREB en el núcleo *accumbens*, donde tiene un profundo efecto en la respuesta de los animales a los estímulos emocionales (Blendy, 2006). Así, incrementos sostenidos de la actividad de CREB en el núcleo *accumbens* reducen los efectos reforzantes de estímulos naturales y de diversas drogas, indicando que puede producir anhedonia y por tanto signos pro-depresivos (Wallace y cols, 2004). En concordancia, la reducción de la actividad de CREB en el núcleo *accumbens* potencia los efectos reforzantes de estos mismos estímulos (Barrot y cols, 2002) y tiene efectos antidepresivos en el test de la natación forzada (Pliakas y cols, 2001). Este papel desempeñado por el CREB en el núcleo *accumbens* discrepa completamente con las propiedades antidepresivas mediadas por el CREB en el hipocampo (Ver Apartado anterior), señalando las importantes diferencias en las consecuencias de la manipulación de la actividad de CREB que dependen de la región cerebral implicada y la dificultad en tratar la depresión con sustancias que produzcan un efecto global sobre la actividad de CREB.

En este sentido, resulta de especial interés el conocimiento de dianas específicas por las que CREB modula específicamente la actividad de la vía VTA-núcleo *accumbens*, como es el caso de la dinorfina. Este ligando endógeno de los receptores opioides kappa media parcialmente la regulación de la conducta de tipo depresiva inducida por los cambios en la actividad de CREB en el núcleo *accumbens* (Carlezon y cols, 2005). De hecho, la administración de antagonistas de los receptores opioides kappa atenúa las consecuencias pro-depresivas de la expresión elevada de CREB en el núcleo *accumbens* (Pliakas y cols, 2001). En la línea de estas observaciones, se ha descrito en ratas expuestas al test de la natación forzada una actividad pro-depresiva y antidepresiva de los agonistas y antagonistas kappa, respectivamente (Mague y cols, 2003). En cambio, el bloqueo genético de los receptores kappa no parece inducir ninguna respuesta emocional alterada en el ratón (Filliol y cols, 2000). El efecto antidepresivo inducido por los antagonistas kappa se produce posiblemente mediante el bloqueo de los receptores kappa de la VTA que inhiben la actividad de las neuronas dopaminérgicas que proyectan al núcleo *accumbens* (Berton y Nestler, 2006). Así, un posible mecanismo por el cual la excesiva activación de CREB inducida por el estrés podría promover síntomas depresivos, como la anhedonia, sería el incremento de expresión de dinorfina en el núcleo *accumbens* que se liberaría en

las proyecciones sobre la VTA, inhibiendo la función dopaminérgica de la VTA (Figura 13).

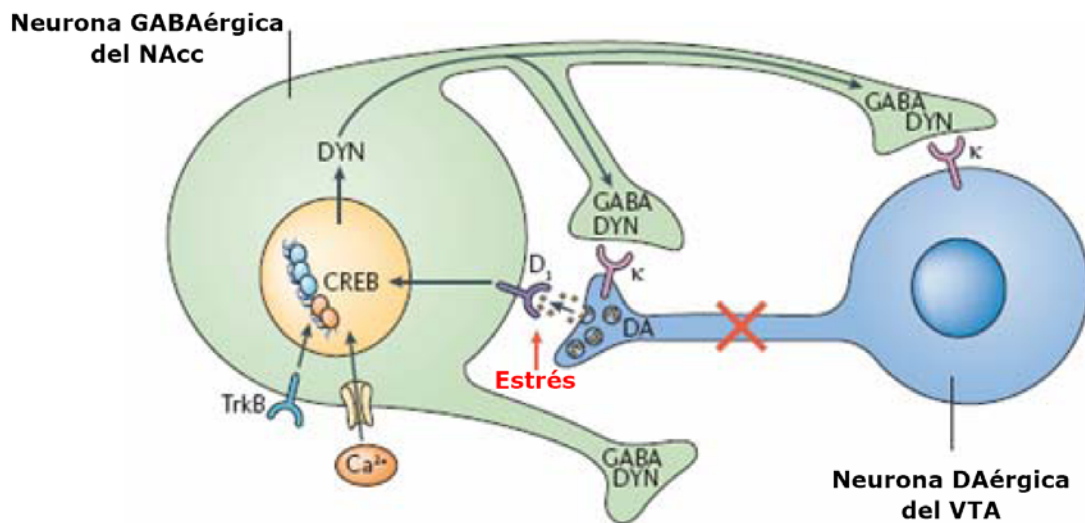


Figura 13. CREB y dinorfina (Dyn) en el núcleo *accumbens* (NAcc) en la depresión. El incremento de expresión de Dyn en el NAcc producido por la estimulación del estrés sobre la actividad de CREB contribuiría a ciertos síntomas de la depresión. CREB es activado por la estimulación los receptores de dopamina D1, o por las vías de señalización reguladas por calcio o TrkB, lo que conlleva un incremento de la expresión de Dyn en el núcleo *accumbens*. La Dyn es liberada en las terminales dopaminérgicas o en los cuerpos y dendritas de las neuronas dopaminérgicas del VTA. La estimulación de los receptores opioides kappa inhibe la actividad de las neuronas del VTA, pudiendo contribuir a la anhedonia y otros síntomas relacionados con la depresión. Así, antagonistas de estos receptores kappa bloquearían las consecuencias de la inducción de Dyn mediada por CREB y ejercerían una actividad antidepresiva. Adaptado de Berton y Nestler (2006).

1.4 Modelos animales de los trastornos emocionales

Los modelos animales son herramientas indispensables en el campo de la psiquiatría puesto que han permitido importantes avances en la comprensión de algunos trastornos mentales (McKinney, 2001). Idealmente, un modelo animal debería reproducir las condiciones humanas respecto a la etiología, sintomatología, tratamiento y fundamentos biológicos de una enfermedad. En el caso de los trastornos emocionales, no es viable poder desarrollar modelos animales que reproduzcan todas las condiciones clínicas de estas enfermedades mentales, teniendo en cuenta que algunas de las características fundamentales de estos desórdenes, como son los sentimientos de culpa, inutilidad y desamparo característicos de la depresión, sólo pueden evaluarse mediante una valoración verbal y responden a funciones cerebrales muy complejas. Por ello, se tiende a realizar una aproximación más pragmática y se desarrollan modelos animales con dos propósitos diferenciados: (1) que sean útiles como herramientas predictivas de la respuesta terapéutica a nuevos agentes farmacológicos y (2) que

reproduzcan algún aspecto fundamental del trastorno que permita analizar la patofisiología de ese rasgo de manera específica. Algunos de estos modelos se obtienen por selección o manipulación genética, por la utilización de agentes ambientales estresantes o por la administración de compuestos farmacológicos que modifican transitoria o permanentemente la respuesta emocional del animal.

1.4.1 Modelos animales de trastornos de ansiedad

Existen numerosos paradigmas para evaluar los niveles de ansiedad, como se resume en la Tabla 2, que se basan en distintos aspectos conductuales. Para una completa revisión, se pueden consultar los trabajos de Millan (2003) y de Fuchs y Flugge (2004).

Tabla 2. Modelos experimentales de ansiedad en roedores. Adaptado de Millan (2003).

I. Estados de ansiedad permanente
(A) Cepas de roedores que manifiestan niveles altos o bajos de ansiedad
(B) Diferencias inter-individuales dentro de una misma cepa
(C) Exposición crónica a estímulos ansiogénicos
(D) Modelos genéticos: ratones transgénicos y <i>knock-out</i>
II. Estados agudos de ansiedad
(A) No condicionados
(1) Exploración (evitación, conflicto)
(i) Caja clara/oscura
(ii) Tablero con agujeros
(iii) Laberinto en cruz elevado
(iv) Campo abierto
(v) Neofobia
(2) Interacción social
(i) Interacción social activa
(ii) Residente/Intruso
(iii) Vocalización ultrasónica inducida por la separación
(3) Respuesta aguda a estímulos aversivos
(i) Postura de <i>freezing</i>
(ii) Vocalización ultrasónica
(iii) Sobresalto
(iv) Parámetros autónomos-cardiovasculares
(4) Comportamiento defensivo frente a estímulos amenazantes
(i) Batería miedo/defensa
(B) Condicionados
(1) Procedimientos con conflicto
(i) Geller–Seifter (operante)
(ii) Test de Conflicto de Vogel
(iii) Supresión condicionada
(iv) Retirada de la señal de seguridad
(v) Aversión de plaza condicionada
(2) Procedimientos sin conflicto
(i) Reexposición a ambiente aversivo
(ii) Exploración de objeto aversivo
(3) Discriminación drogas
(i) Compuestos ansiogénicos

Las pruebas conductuales que se basan en la exposición de los animales a un ambiente novedoso, que se conocen como paradigmas de evitación no condicionada (Tabla 2), son las más utilizadas para evaluar los niveles de ansiedad en los animales de experimentación (Fuchs y Flugge, 2004). Consisten en laberintos que están formados por compartimientos aversivos y no aversivos. El animal es expuesto a una situación de conflicto entre el impulso natural a explorar el ambiente y la tendencia innata a evitar lo desconocido, especialmente los ambientes con alguna característica aversiva. Los niveles de ansiedad se evalúan como el comportamiento de acercamiento hacia el compartimiento aversivo. Los tres más relevantes son:

- el laberinto elevado en cruz: se basa en la aversión innata de los roedores por la altura. Consiste en una cruz elevada con dos brazos cerrados opuestos, perpendiculares a dos brazos abiertos (Figura 14). Los animales evitan los brazos abiertos porque se hayan desprotegidos frente a la altura del laberinto. Se evalúa el tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos en comparación con la exploración de los brazos cerrados. Un animal con un elevado nivel de ansiedad, explorará menos los brazos abiertos mientras que esta evitación del compartimiento aversivo se reducirá si el animal recibe un tratamiento con una sustancia ansiolítica.

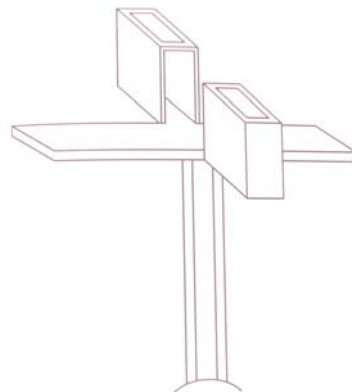


Figura 14. Laberinto elevado en cruz.

- la caja clara/oscura: se basa en la aversión natural de los roedores hacia los ambientes intensamente iluminados. Consiste en una caja con dos compartimientos bien diferenciados, uno amplio e intensamente iluminado y otro más reducido con una iluminación tenue, conectados por un pasillo neutral que permite la libre circulación del animal. Se evalúa la latencia de entrada al compartimiento aversivo, el tiempo transcurrido en cada uno de los compartimientos, el número de transiciones y la actividad locomotora. Un animal con un elevado nivel de ansiedad, explorará menos el

compartimiento aversivo y pasará más tiempo en el compartimiento oscuro, que percibe como menos peligroso, mientras que esta evitación del compartimiento aversivo se reducirá si el animal recibe un tratamiento con una sustancia ansiolítica.

- el campo abierto: se basa en la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos e intensamente iluminados. Consiste en una superficie blanca y amplia, delimitada por paredes altas, que se ilumina intensamente. Cuando el animal es expuesto a este ambiente, del que no puede escapar, la tendencia natural hace que el animal evite explorar la zona central y pase la mayor parte del tiempo en la periferia del área (tigmotaxia). Se evalúa la locomoción y la conducta exploratoria, así como la actividad autónoma estimada por el número de defecaciones y micciones. La administración de sustancias ansiolíticas producirá un aumento de la exploración de la zona central y una reducción de la actividad autónoma.

1.4.2 Modelos animales de trastornos depresivos

Como se ha comentado anteriormente, resulta especialmente difícil replicar en un modelo animal la complejidad de la etiología y la sintomatología de trastornos del estado de ánimo como la depresión. Entre todos los modelos existentes (Tabla 3), podemos destacar dos grandes grupos: aquellos que permiten evaluar el estado emocional de los animales en respuesta a una exposición aguda al estrés y aquellos que pretenden inducir en los animales un estado similar al desarrollado por los trastornos del estado de ánimo mediante la aplicación repetida de diferentes estímulos estresantes.

Tabla 3. Principales modelos animales de trastornos depresivos con sus ventajas y sus inconvenientes. ADs: antidepresivos. Adaptado de Nestler y cols (2002b).

	Pros	Contras
Test de la natación forzada (Porsolt)	Responde bien al tratamiento con ADs Relativamente fácil de hacer	Responde a tratamientos agudos
Test de suspensión de la cola	Responde bien al tratamiento con ADs Relativamente fácil de hacer	Responde a tratamientos agudos
Estrés crónico	Induce síntomas de tipo depresivo	Difícil de reproducir y de revelar efecto tratamiento ADs
Estrés en edad temprana	Induce síntomas de tipo depresivo Efectivo en roedores y primates	Cambios en comportamiento social en roedores y efecto del tratamiento con ADs no bien caracterizados
Cría selectiva	Se centra en la susceptibilidad individual para la depresión	Ninguna línea perfectamente establecida hasta la fecha
Modelos de refuerzo	Aportan una medida del estado afectivo y modelan síntomas motivacionales de la depresión Responden a ADs	Todavía no validados en modelos tradicionales de depresión

Los modelos más utilizados para evaluar el estado emocional de los animales en respuesta a una exposición aguda al estrés son:

- la natación forzada o test de Porsolt: descrito originalmente por Porsolt y cols (1977), consiste en evaluar la conducta de desespero ante la imposibilidad de escapar de un tanque de agua en el que los animales se ven forzados a nadar (Figura 15). El tiempo que el animal transcurre inmóvil, sin intentar escapar o nadar, se considera como signo de desespero y se compara con el sentimiento de desesperanza característico de estados depresivos. La administración de sustancias antidepresivas reduce el tiempo de inmovilidad de los animales.

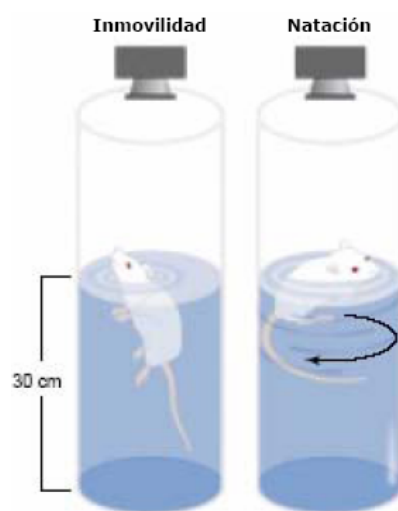


Figura 15. Natación forzada o test de Porsolt. Adaptado de Cryan y cols (2002).

- la suspensión por la cola: conceptualmente similar a la natación forzada, consiste en evaluar la conducta de desespero cuando el animal es suspendido por la cola sobre una barra horizontal a cierta altura del suelo (Steru y cols, 1985). Esta situación aversiva induce un estado de agitación que ante la imposibilidad de escapar, acaba generando una postura de inmovilidad. Se evalúa el tiempo en el que el animal adopta esta postura de inmovilidad, que se considera una conducta de desespero y por tanto asimilable a un síntoma de tipo depresivo. La administración de sustancias antidepresivas reduce el tiempo de inmovilidad de los animales.

De entre los modelos animales que inducen estados de tipo depresivo mediante la exposición repetida al estrés, cabe destacar:

- el estrés crónico moderado impredecible: se expone al animal durante varias semanas a una serie de situaciones estresantes, como cambios en

las condiciones de estabulación, exposición a ruidos y olores, natación forzada en agua fría o cambios en los ciclos de luz/oscuridad, que inducen una reducción en la sensibilidad hacia los refuerzos positivos (generalmente cuantificada por el consumo de agua azucarada) similar a la anhedonia descrita en los desórdenes depresivos (Willner, 2005).

- el estrés perinatal: la exposición a situaciones estresantes en las primeras etapas de la vida es un factor fundamental que determina la susceptibilidad para padecer trastornos emocionales en la edad adulta (Gutman y Nemeroff, 2003). Se realiza de manera periódica la separación materna de las crías en edad muy temprana para inducir trastornos afectivos en la edad adulta de los animales separados temporalmente de sus madres.

Existen otros modelos animales de los trastornos del estado de ánimo que se basan en la selección genética de animales sensibles al estrés o en la ingeniería genética que permite evaluar el papel desarrollado por diversos genes en las manifestaciones emocionales. Para una completa revisión del tema, consultar los trabajos de Nestler y cols (2002b) y de Sillaber y Holsboer (2004).

2. SISTEMA CANNABINOIDE Y TRASTORNOS EMOCIONALES

2.1 Introducción al sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es un importante sistema de modulación de múltiples respuestas fisiológicas tanto a nivel central como periférico, constituido por una serie de receptores cannabinoides, ligandos endógenos y enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de estos ligandos. Debe su nombre al hecho de que su descubrimiento se produjo en el seno de la investigación sobre los mecanismos de acción de los compuestos psicoactivos de la planta del cannabis.

Aunque las primeras referencias históricas del uso del *Cannabis sativa* con fines médicos y recreativos datan de hace más de 4000 años, no fue hasta pasada la mitad del siglo XX que se identificó la estructura química de su principal compuesto activo, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Mechoulam y Gaoni, 1965). A pesar de ese importante avance, hubo que esperar un cuarto de siglo para que se empezaran a descubrir los componentes endógenos del sistema cannabinoide. Así, durante la década de los 80 diversos estudios sugirieron la presencia de receptores cannabinoides en el sistema nervioso central (Razdan, 1986; Devane y cols, 1988), pero no fue hasta 1990 cuando se clonó el primer receptor cannabinoide (receptor CB₁) (Matsuda y cols, 1990). Más tarde, en 1993, Munro y cols clonaron el receptor cannabinoide CB₂. La anandamida y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) fueron identificados como ligandos endógenos de los receptores cannabinoides (Devane y cols, 1992; Mechoulam y cols, 1995; Sugiura y cols, 1995). A partir de esos hallazgos, el conocimiento sobre la complejidad del sistema endocannabinoide y su relevancia fisiológica ha ido creciendo sin cesar y ha permitido descubrir el importante potencial terapéutico que presenta en numerosas patologías, incluyendo los trastornos emocionales (Fowler, 2005).

2.1.1 Cannabinoides endógenos

Los ligandos endógenos de los receptores cannabinoides son compuestos de naturaleza lipídica de la familia de los eicosanoides derivados de la degradación de fosfolípidos de membrana (Piomelli, 2003) (Figura 16). Los más representativos son la etanolamida del ácido araquidónico, también llamada anandamida (Devane y cols, 1992) y el 2-AG (Mechoulam y cols, 1995, Sugiura y cols, 1995). Otros cannabinoides endógenos que han sido identificados posteriormente son el 2-araquidonilgliceril éter, también llamado noladin éter, (Hanus y cols, 2001), la virodamina (Porter y cols, 2002) y la N-araquidonildopamina (Huang y cols, 2002).

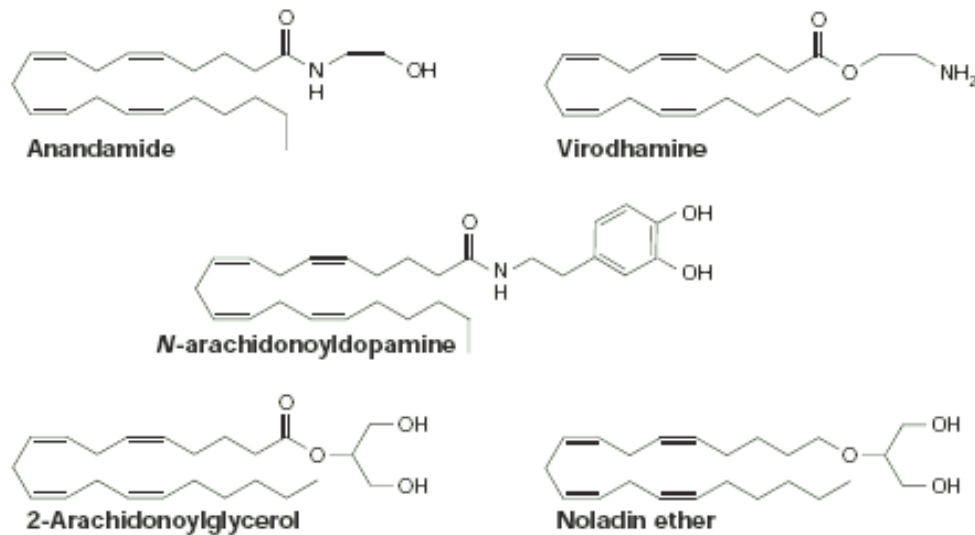


Figura 16. Estructura química de los principales compuestos endógenos que se unen a los receptores cannabinoides. Adaptado de Piomelli (2003).

Los endocannabinoides presentan algunas de las características necesarias para ser considerados neurotransmisores clásicos: se sintetizan y liberan en neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membranas y son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. Sin embargo, los endocannabinoides presentan dos características fundamentales que los diferencian del resto de neurotransmisores. Por un lado, los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados (Ver Apartado 2.1.6) y, por otra parte, no se acumulan en el interior de vesículas sinápticas. Así, son compuestos que se sintetizan bajo demanda que actúan en las proximidades del lugar donde se han liberado (Di Marzo y cols, 1994). Una vez han actuado, son rápidamente inactivados por la acción de enzimas específicas de degradación (Piomelli, 2003). En el caso de la anandamida, la síntesis se realiza a partir de la fosfatidiletanolamina presente en la membrana celular mediante la acción sucesiva de 2 enzimas, la N-acetiltransferasa y la fosfolipasa D (Figura 17). La anandamida es sintetizada en el momento en que existe una necesidad de la misma (Di Marzo y cols, 1994). Una vez liberada, su acción viene determinada por dos procesos que limitan su disponibilidad (Figura 17): el transporte desde la hendidura sináptica hacia el interior de la célula por difusión pasiva o por un transportador selectivo (Piomelli, 2003), y la hidrólisis provocada por dos sistemas enzimáticos, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Cravatt y cols, 1996) y la lipasa de monoacilglicéridos (Dinh y cols, 2002).

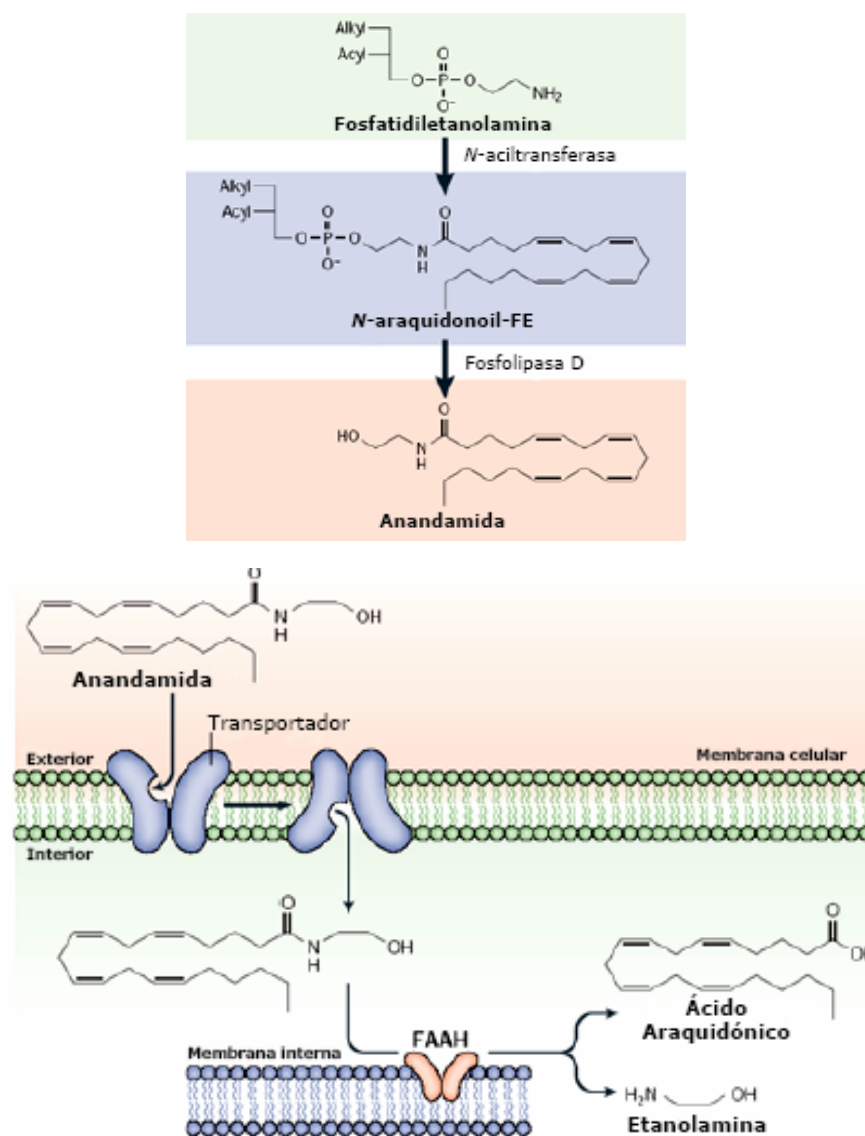


Figura 17. Mecanismo de formación (superior) e inactivación (inferior) de la anandamida (Piomelli, 2003).

El 2-AG es el cannabinoide endógeno más abundante en el cerebro y su concentración es aproximadamente 200 veces superior a la de la anandamida (Stella y cols, 1997). El proceso de formación del 2-AG y otros 2-monoacilglicéridos está mediado de manera mayoritaria por la fosfolipasa C y se produce igualmente bajo demanda (Piomelli, 2003). Su eliminación, como la anandamida, se realiza a través de un proceso que consta de dos pasos sucesivos, recaptación y degradación enzimática. La recaptación del 2-AG tiene lugar a través del mismo sistema de transporte que la anandamida (Piomelli y cols, 1999). En cambio, aunque el 2-AG es también sustrato de la FAAH, la lipasa de monoacilglicéridos parece estar más implicada en su degradación (Dinh y cols, 2002).

2.1.2 Cannabinoides exógenos

Existen numerosos compuestos exógenos naturales o sintéticos con actividad cannabinoide que han contribuido en gran manera al conocimiento del sistema cannabinoide endógeno. Entre los cannabinoides naturales destaca el Δ^9 -THC, principal compuesto psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*. Se han descrito más de sesenta compuestos activos en dicha planta, algunos de los cuales presentan propiedades psicoactivas como el Δ^8 -tetrahidrocannabinol o el cannabinol, y otros no, como es el caso del cannabidiol (Pertwee, 2008).

Los estudios que relacionan la estructura de los cannabinoides naturales con su actividad farmacológica han permitido sintetizar moléculas con una conformación capaz de fijarse de manera selectiva a los receptores cannabinoides. En algunos casos, estos cannabinoides sintéticos presentan unas características farmacocinéticas, de selectividad y de afinidad intrínseca por los receptores cannabinoides que les confieren un interesante potencial terapéutico. Actualmente, los cannabinoides sintéticos con actividad agonista incluyen dos grandes grupos de compuestos: (1) los derivados estructurales del Δ^9 -THC tales como HU-210, CP-55,940 y nabilona (Figura 18), (2) los aminoalquilindoles, entre los que cabe destacar el WIN 55,212-2. Estos compuestos exhiben diferencias en cuanto a su afinidad y actividad intrínseca para los receptores cannabinoides (Howlett y cols, 2002). Comparados con el Δ^9 -THC, los compuestos CP-55,940 y WIN 55,212-2 tienen una mayor afinidad para los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, y su eficacia para activar ambos receptores es mayor. El CP-55,940 presenta igual afinidad para el receptor CB₁ que para el receptor CB₂, mientras que el WIN 55,212-2 presenta una afinidad ligeramente mayor para el receptor CB₂ (Pertwee, 2008).

Los estudios de estructura-actividad también han permitido el desarrollo de antagonistas selectivos para los receptores cannabinoides. Así, el SR141716A (rimonabant) (Rinaldi-Carmona y cols, 1994) y el SR144528 (Rinaldi-Carmona y cols, 1998) son los dos primeros compuestos sintetizados con actividad antagonista selectiva para los receptores CB₁ y CB₂, respectivamente (Figura 18).

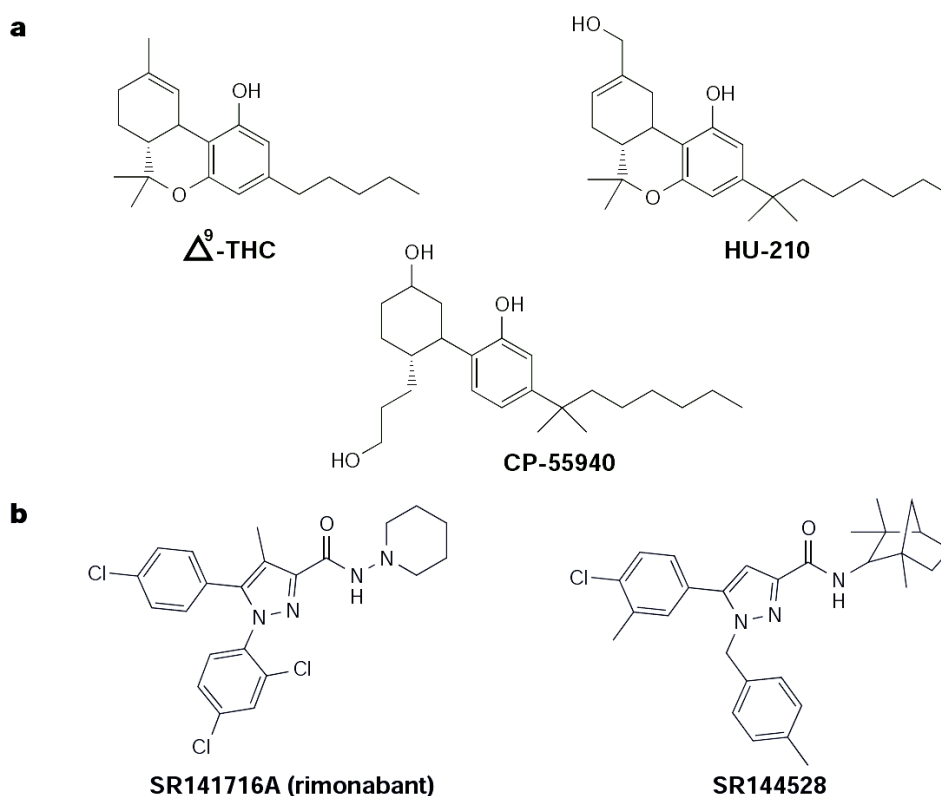


Figura 18. Estructura química de algunos de los compuestos derivados de la planta *Cannabis sativa* y compuestos sintéticos que se unen a receptores cannabinoides. a) Agonistas de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. b) Antagonistas selectivos CB₁ (SR141716A, rimonabant) y CB₂ (SR144528). Adaptado de Piomelli (2003).

2.1.3 Receptores cannabinoides

Los cannabinoides ejercen su acción farmacológica principalmente mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana. Hasta el momento, los dos tipos de receptores mejor caracterizados son el receptor cannabinoide CB₁ (Matsuda y cols, 1990) y el receptor cannabinoide CB₂ (Munro y cols, 1993). Recientemente, se ha aceptado que el receptor huérfano GPR55 sea considerado como otro receptor con actividad cannabinoide (Baker y cols, 2006; Ryberg y cols, 2007). Asimismo, existen evidencias de que puedan existir otros receptores acoplados a proteínas G con actividad cannabinoide (Brown, 2007). Aparte de los receptores acoplados a proteínas G, la anandamida es capaz de activar el receptor de potencial transitorio vanilloide de tipo 1, que es un canal catiónico no selectivo activado por diferentes ligandos, entre los que destaca la capsaicina (Pertwee, 2005).

El receptor CB₁ está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y se considera que es el receptor acoplado a proteína G más abundante en el cerebro de mamíferos (Herkenham y cols, 1991). Mediante la aplicación de diferentes

técnicas de autorradiografía y de inmunohistoquímica, se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham y cols, 1991) (Figura 19). Así, la distribución de los receptores CB₁ se encuentra estrechamente relacionada con sus funciones fisiológicas, expresándose en áreas cerebrales que contribuyen al control del movimiento (caudado-putamen, globo pálido, núcleo entopeduncular, sustancia negra y cerebelo), cognición y memoria (hipocampo, corteza cingulada, corteza prefrontal), procesamiento de emociones y respuestas motivacionales (amígdala, núcleo *accumbens*, corteza olfatoria), percepción dolorosa (sustancia gris periacueductal, asta dorsal de la médula espinal), e integración neuroendocrina (PVN y otros núcleos del hipotálamo) (Matsuda y cols, 1993). El receptor CB₁ se encuentra principalmente expresado en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, de manera que ejerce un papel muy importante como modulador de sinapsis de diferente naturaleza (Rodríguez de Fonseca y cols, 2005).

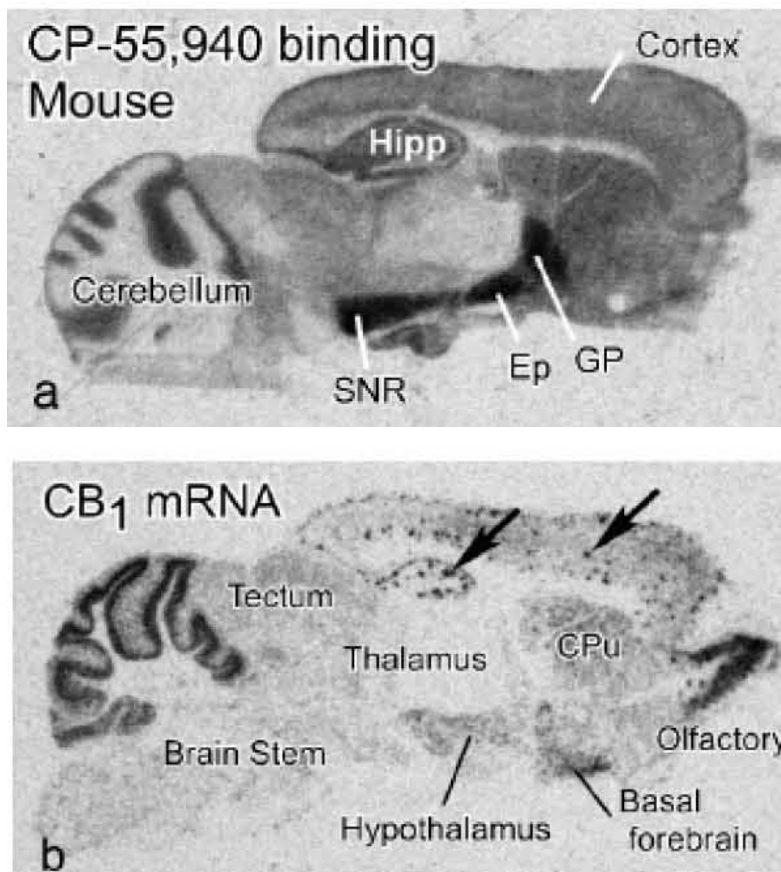


Figura 19. Distribución del receptor CB₁ revelada por autorradiografía (izquierda) y expresión del mRNA para el receptor CB₁ (derecha) en un corte sagital de cerebro de ratón. Adaptado de Howlett y cols (2002).

Igualmente, el receptor CB₁ se encuentra en órganos y tejidos periféricos como el bazo, pulmón, endotelio vascular, músculo liso, adipocitos, tracto gastrointestinal,

hígado y páncreas entre otros, donde ejerce también un relevante papel modulador (Galiègue y cols, 1995; Pertwee, 2001; Bermúdez-Silva, 2008).

En cuanto al receptor CB₂, durante años se ha creído que se localizaba a nivel periférico en células del sistema inmunitario (Galiègue y cols, 1995), y a nivel central únicamente en la microglía y en los astrocitos (Walter y cols, 2003). Esta distribución generó interés sobre el control que el receptor CB₂ podía ejercer en las funciones inmunes a nivel central (Cabral y cols, 2008) y en procesos celulares fundamentales como la proliferación y la supervivencia neuronal (Fernández-Ruiz y cols, 2007). En cambio, recientemente se ha demostrado la presencia del receptor CB₂ en neuronas del tronco cerebral (Van Sickle y cols, 2005), hallazgo que abre nuevas expectativas sobre la funcionalidad de este receptor.

Existen todavía escasas evidencias sobre la distribución y funcionalidad del receptor GPR55. Hasta la fecha, tan sólo se ha podido demostrar su expresión en el bazo y en regiones discretas del cerebro humano como los núcleos caudado y putamen (Sawzdargo y cols, 1999). Además, también se ha demostrado su expresión en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, donde se expresa abundantemente (Lauckner y cols, 2008). Esta localización podría tener relación con la participación de este receptor en la señalización del dolor descrita recientemente (Staton y cols, 2008). Diversos cannabinoides endógenos y exógenos presentan una actividad agonista sobre el receptor GPR55 aunque la farmacología de este receptor es distinta a la de los receptores CB₁ y CB₂ (Brown, 2007). Recientemente, se ha propuesto que un derivado del 2-AG sea un posible ligando endógeno específico de este receptor (Oka y cols, 2008).

2.1.4 Mecanismos de transducción de señal asociados a los receptores cannabinoides

Como consecuencia de la activación de los receptores cannabinoides, se produce un cambio funcional en la estructura de las proteínas G que se encuentran acopladas a dichos receptores. Los receptores cannabinoides se unen principalmente a proteínas G de tipo inhibitorio o Gi/o y este fenómeno constituye el primer paso que dará lugar a un cambio en la actividad de diferentes rutas o vías de señalización intracelular (sistemas efectores o transductores de señal). Así, tras la activación de los receptores CB₁ se produce una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la ruta de las MAP quinasas (Figura 20) (Howlett y cols, 2002). La inhibición de la vía de la adenilato ciclasa hace que los niveles intracelulares de adenosina-5'-monofosfato cíclico (AMPc) disminuyan. De esta forma se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de AMPc involucradas en

procesos de señalización intracelular y de expresión génica. La activación de los receptores CB₁ también induce una inhibición de los canales de calcio (Ca²⁺) voltaje dependiente tipo N y P/Q y un aumento de la conductancia de potasio (K⁺). Este mecanismo podría ser el responsable del efecto inhibitorio que tienen los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisores. Por otra parte, los cannabinoides son unos potentes activadores de la ruta de las MAP quinasa, vía implicada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación celular (Bouaboula y cols, 1995; Howlett, 2005).

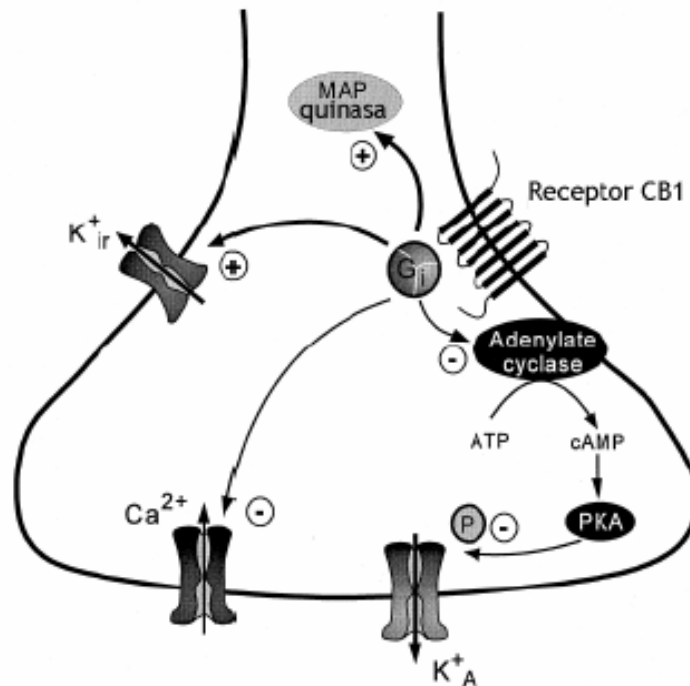


Figura 20. Mecanismos de transducción de señal estimulados por el receptor cannabinoide CB₁. La activación de los receptores CB₁ da lugar a una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la ruta de las MAP quinasa. Adaptado de Ameri (1999).

La activación del receptor CB₂ desencadena procesos de transducción de señales intracelulares similares a los descritos para el receptor CB₁, a excepción de la regulación de los canales de calcio y potasio (Howlett, 2002).

En cambio, la activación del receptor GPR55 induce cambios en la actividad de diferentes vías de señalización intracelular que tienen efectos opuestos a los producidos por la activación del receptor CB₁. Así, el receptor GPR55 induce un incremento de los niveles de calcio intracelular por la liberación de las reservas celulares mediante la acción de las proteínas Gαq a las que está acoplado, de la fosfolipasa C y de la GTPasa RhoA. Además, este receptor inhibe las corrientes de potasio a través de los canales de tipo M. Como resultado de estos procesos, la activación del receptor GPR55 produce un incremento de la excitabilidad neuronal (Lauckner y cols, 2008).

2.1.5 Funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide está implicado en la regulación de gran variedad de procesos fisiológicos, entre los que cabe destacar el aprendizaje y la memoria, la ingesta y el metabolismo, la transmisión nociceptiva, la coordinación motora, el control de las emociones y el circuito del refuerzo, así como también en la mediación de diferentes procesos a nivel cardiovascular e inmunológico. La Tabla 4 resume los principales procesos fisiológicos o fisiopatológicos en los que participa el sistema endocannabinoide y los efectos de los cannabinoides sobre dichos procesos. En general, el sistema endocannabinoide se halla silenciado y se sobreactiva como sistema de recuperación en respuesta a situaciones de estrés y a alteraciones de la homeostasis. El amplio espectro de procesos en los que participa se debe en parte a la capacidad para modular, generalmente inhibiendo, la liberación de los neurotransmisores clásicos (Degroot y Nomikos, 2007).

En los Apartados 2.2 y 2.3 se detallará la participación del sistema cannabinoide en el control de las emociones y su relación con los trastornos de ansiedad y la depresión.

Tabla 4. Procesos fisiológicos o fisiopatológicos en los que se ha propuesto una función para los cannabinoides (endógenos y exógenos).

Procesos fisiológicos o fisiopatológicos	Efectos de los agonistas cannabinoides	Revisiones recientes
1. Aprendizaje y memoria	Déficit cognitivo	Riedel y Davies, 2005
2. Control motor	Hipolocomoción, Catalepsia, Ataxia	Fernández-Ruiz y González, 2005
3. Temperatura corporal	Hipotermia	Wenger y Moldrich, 2002
4. Ansiedad	Ansiolisis, Ansiogénesis	Viveros y cols, 2005
5. Motivación	Euforia, Disforia	Solinas y cols, 2008
6. Neurodegeneración	Neuroprotección	van der Stelt y Di Marzo, 2005
7. Dolor	Antinocicepción	Lever y Rice, 2007
8. Inflamación	Antiinflamatorio	Ashton, 2007
9. Sistema inmunitario	Inmunosupresión	Klein y Cabral, 2006
10. Sistema cardiovascular	Vasodilatación, Aumento de la frecuencia cardíaca, Hipotensión	Sarzani, 2008
11. Ingesta	Aumento del apetito	Di Marzo y Matias, 2005
12. Sistema reproductor	Inhibición secreción hormonal	Rossato y cols, 2008
13. Metabolismo óseo	Estimulación de la formación de hueso, Inhibición de la reabsorción	Bab y Zimmer, 2008
14. Cáncer	Antitumoral	Velasco y cols, 2007
15. Sueño	Estimulación del sueño	Murillo-Rodríguez, 2008

2.1.6 Los endocannabinoides como mensajeros retrógrados

Una característica muy particular de los endocannabinoides, en contraste con otros neurotransmisores, es que actúan como mensajeros retrógrados de muchas sinapsis centrales. La liberación de los endocannabinoides desde las neuronas postsinápticas estimula los receptores CB₁ situados a nivel presináptico, inhibiendo la liberación de diferentes neurotransmisores (Wilson y Nicoll, 2002) (Figura 21). Mediante la señalización retrógrada, los endocannabinoides son capaces de participar en la regulación a corto plazo de sinapsis inhibitorias (mediadas por la liberación de GABA) y excitatorias (mediadas por la liberación de glutamato), dando lugar a fenómenos identificados como supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI) y supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE), respectivamente (Chevalleyre y cols, 2006) (Figura 21).

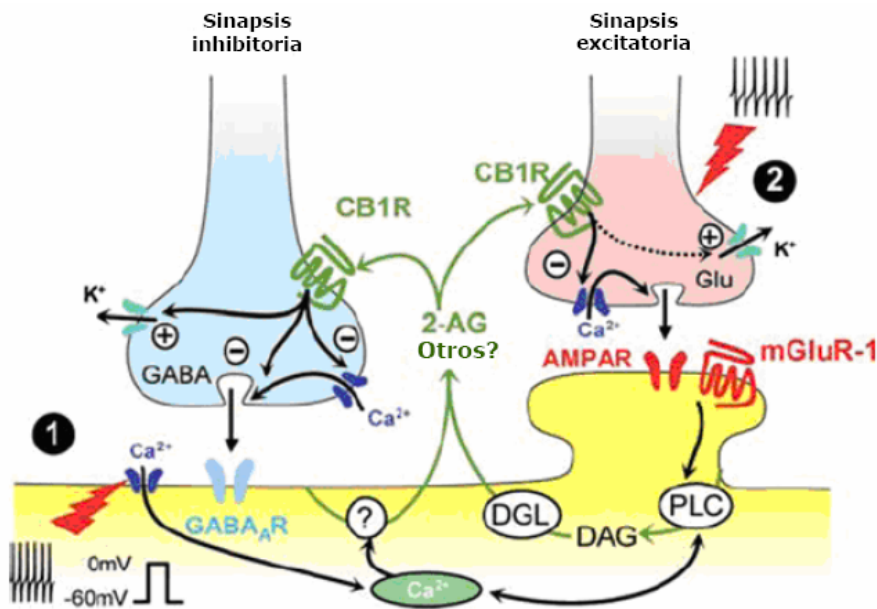


Figura 21. Representación esquemática de la vía retrógrada de señalización de los endocannabinoides. La regulación a corto plazo de las sinapsis GABAérgicas (DSI) (izquierda) y glutamatérgicas (DSE) (derecha) se produce por dos mecanismos: (1) el aumento de Ca²⁺ a nivel postsináptico, secundario a la despolarización de las neuronas postsinápticas, y (2) la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). Estos dos mecanismos pueden actuar de manera independiente o bien cooperar en la liberación de endocannabinoides al espacio sináptico. Estos endocannabinoides activan los receptores CB₁ situados a nivel presináptico, produciendo una inhibición de la entrada de Ca²⁺ en la neurona presináptica y/o una activación de los canales de K⁺, disminuyendo la probabilidad de liberación de vesículas que contienen neurotransmisores. Adaptado de Chevalleyre y cols (2006).

Además de esta regulación inmediata de las sinapsis, el sistema endocannabinoide participa en la plasticidad sináptica a largo plazo. Así, la señalización retrógrada mediada por endocannabinoides se ha relacionado con el fenómeno denominado depresión a largo plazo (LTD) que requiere la activación postsináptica de los

receptores mGlu5 y un incremento del Ca^{2+} postsináptico (Robbe y cols., 2002). Tanto los procesos de DSE y DSI como los de LTD inducidos por los endocannabinoides se han descrito en diversas áreas cerebrales (núcleo *accumbens*, hipocampo, amígdala, corteza, cerebelo) y son de crucial importancia en procesos de plasticidad sináptica y de reafirmación de circuitos neuronales determinados, que contribuyen a la formación la memoria asociada a la experiencia (Chevalleyre y cols, 2006).

2.2 Sistema endocannabinoide y ansiedad

Una de las características fundamentales del sistema endocannabinoide es su participación en la recuperación del balance homeostático del organismo después de la exposición a un estímulo. Así, a nivel emocional el sistema endocannabinoide juega un papel relevante en el control de la ansiedad (Viveros y cols, 2005). Existen numerosas evidencias que avalan este hecho. En primer lugar, el receptor CB_1 está profusamente expresado en las áreas cerebrales que participan en el control de las respuestas emocionales, como son la amígdala, la corteza cingulada y entorrinal, el hipocampo, el núcleo *accumbens* y la sustancia gris periacueductal (Tsou y cols, 1998). En segundo lugar, los cannabinoides modulan la liberación de diversos neurotransmisores implicados en el control de la ansiedad: inhiben la neurotransmisión de noradrenalina, GABA, glutamato, dopamina, acetilcolina y 5-HT en algunas áreas cerebrales (Szabo y Schlicker, 2005) e inhiben la acción de algunos neuropéptidos ansiogénicos como la CCK y el CRF (Schlicker y Kathmann, 2001). En tercer lugar, numerosos estudios farmacológicos demuestran que los agonistas cannabinoides modifican los niveles de ansiedad. De hecho, una de las razones por las que se consume cannabis es por la disminución de la ansiedad que suele acompañar al efecto euforizante del compuesto (Williamson y Evans, 2000). Pero el consumo de cannabis puede producir también efectos opuestos a los deseados sobre la ansiedad, induciendo un estado de ansiedad elevada e incluso ataques de pánico, especialmente en los consumidores noveles (Hall y Solowij, 1998). Este efecto opuesto de los cannabinoides sobre la ansiedad ha sido claramente evidenciado en modelos animales de experimentación, en los que dosis bajas de agonistas cannabinoides producen un efecto ansiolítico mientras que dosis altas inducen un incremento de los niveles de ansiedad (Onaivi y cols, 1990; Viveros y cols, 2005). De la misma forma, se ha observado un efecto ansiolítico o ansiogénico tras un incremento leve o elevado de la concentración de endocannabinoides endógenos, respectivamente (Kathuria y cols, 2003; Rubino y cols, 2008).

Una posible hipótesis que puede explicar este efecto bifásico de los cannabinoides sobre la ansiedad es la diferente sensibilidad de los receptores cannabinoides que modulan las sinapsis inhibitorias (GABA) y las excitatorias (glutamato). Se ha demostrado que un agonista cannabinoide como el WIN 55, 212-2 es un orden de magnitud menos potente inhibiendo la transmisión glutamatérgica que la GABAérgica, posiblemente debido a la diferente naturaleza de los receptores cannabinoides existentes en los dos tipos de sinapsis (Hájos y Freund, 2002). De esta manera, dosis bajas del agonista inducirían una reducción de la inhibición GABAérgica, resultando en una respuesta ansiolítica, mientras que dosis altas inhibirían la liberación de glutamato, produciendo un estado de ansiedad.

Por último, cabe destacar la información que ha aportado el desarrollo de ratones deficientes en el receptor CB₁ (Ledent y cols, 1999) sobre el papel del sistema endocannabinoide en el control de la ansiedad. Estos animales manifiestan unos niveles elevados de ansiedad en diferentes paradigmas conductuales (Martín y cols, 2002; Haller y cols, 2002; Urigüen y cols, 2004), que pueden estar relacionados con una hipersensibilidad al estrés (Martín y cols, 2002; Urigüen y cols, 2004). Asimismo, estos animales presentan un menor efecto de los ansiolíticos bromazepam y buspirona (Urigüen y cols, 2004). Por otro lado, estudios realizados en estos mismos ratones han sugerido la existencia de un nuevo receptor cannabinoide que participaría en el control del estado emocional y que apoyaría la hipótesis de la diferente sensibilidad de los receptores cannabinoides que modulan las sinapsis inhibitorias y las excitatorias. En efecto, Haller y colaboradores demostraron que el rimonabant, antagonista cannabinoide, era capaz de producir efectos ansiolíticos tanto en ratones normales como en ratones carentes del receptor CB₁, mientras que el AM251, antagonista selectivo del receptor CB₁, inducía un incremento de los niveles de ansiedad en los ratones normales sin producir ninguna alteración en los ratones mutantes para este receptor (Haller y cols, 2004). Estos resultados sugirieron que el receptor CB₁ y el nuevo receptor cannabinoide propuesto tendrían un efecto opuesto sobre la ansiedad, mediando el receptor CB₁ los efectos ansiolíticos de los cannabinoides y el nuevo receptor los ansiogénicos.

2.3 Sistema endocannabinoide y depresión

2.3.1 Evidencias clínicas y preclínicas

Existen numerosas evidencias que demuestran que el sistema endocannabinoide es un importante sustrato para el control de las emociones (Valverde, 2005) y que sugieren la participación de este sistema en la fisiopatología de la depresión (Hill y

Gorzalka, 2005a; Mangieri y Piomelli, 2007). Destaca el solapamiento entre los procesos fisiológicos alterados en la depresión (motivación, ansiedad, funciones cognitivas y vegetativas) y los procesos en los que participa la señalización cannabinoide, hecho que indica que la participación del sistema endocannabinoide en el desarrollo de la depresión se puede producir a diferentes niveles.

A pesar de que el consumo prolongado de cannabis y la abstinencia de esta sustancia han sido frecuentemente asociados a la depresión, no se ha podido establecer una relación causal clara entre el consumo de cannabis y los trastornos depresivos (Degenhardt y cols, 2003; Moore y cols, 2007). Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos realizados para evaluar la eficacia del rimonabant en la obesidad revelaron que la aparición de síntomas depresivos fue la primera causa de abandono en estos ensayos (Pi-Sunyer y cols, 2006), indicando que el bloqueo prolongado del receptor CB₁ comporta un incremento del riesgo de desarrollar una depresión. Igualmente, existen otras evidencias clínicas de la implicación del sistema cannabinoide en la depresión. El grupo de Hungund demostró una hiperactividad del sistema endocannabinoide en los cerebros de pacientes deprimidos suicidas, manifestada por un incremento en la densidad de receptores CB₁ y de los niveles de endocannabinoides en la corteza prefrontal (Vinod y Hungund, 2006). Otros grupos, en cambio, describieron una disminución de los niveles de endocannabinoides en pacientes deprimidos (Koethe y cols, 2007; Hill y cols, 2008). Estos resultados aparentemente contradictorios podrían estar relacionados con una modulación diferencial del sistema endocannabinoide en la presencia de una depresión mayor o menor (Serra y Fratta, 2007).

En el caso de la investigación realizada en animales de experimentación existe un debate abierto sobre la actividad del receptor CB₁ en las manifestaciones depresivas. Si bien la mayoría de estudios describen efectos antidepresivos tras la estimulación del sistema endocannabinoide (Hill y Gorzalka, 2005b; Gobbi y cols, 2005; Mangieri y Piomelli, 2007), otros refieren efectos antidepresivos tras el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ (Griebel y cols, 2005; Witkin y cols, 2005). Esta discrepancia puede deberse a diferencias metodológicas o a la existencia de un nuevo receptor cannabinoide aun no caracterizado que participaría en el control emocional ejerciendo una función opuesta al receptor CB₁ que presentaría una diferente sensibilidad hacia los antagonistas utilizados en los estudios farmacológicos anteriormente mencionados (Hill y Gorzalka, 2005a). De todas formas, la hipótesis que postula que la estimulación del receptor CB₁ promueve efectos antidepresivos se ve además reforzada por el hecho de que los animales carentes del receptor CB₁ manifiestan una serie de características fenotípicas comparables con diversos síntomas de la depresión, como se resume en la Tabla

5, que lo convierten en un posible modelo animal de depresión (Hill y Gorzalka, 2005a).

Tabla 5. Similitudes entre los síntomas de la depresión y características fenotípicas de los ratones carentes del receptores CB₁. Adaptado de Hill y Gorzalka (2005a).

Síntomas de la depresión	Fenotipo del ratón CB ₁ knock-out
Estado de ánimo bajo, ansiedad	Incremento de la ansiedad y de la susceptibilidad a padecer los efectos del estrés crónico (Martín y cols, 2002)
Anhedonia	Disminución de la motivación hacia los refuerzos naturales (Sanchis-Segura y cols, 2004) y hacia las drogas de abuso (Maldonado y cols, 2006)
Disminución del apetito y del peso corporal	Reducción de la ingesta y del peso corporal (Cota y cols, 2003)
Predominancia de las memorias emocionales aversivas	Deficiencia en la extinción de las memorias aversivas (Marsicano y cols, 2002)
Hiperactividad del eje HPA	Hiperactividad del eje HPA en respuesta al estrés (Cota y cols, 2003; Barna y cols, 2004; Urigüen y cols, 2004)
Atrofia hipocampal, neurodegeneración	Incremento en la susceptibilidad a la neurotoxicidad (Marsicano y cols, 2003), deficiencia en la neurogénesis hipocampal (Jin y cols, 2004) y en la liberación de factores tróficos en respuesta a insultos (Khaspekov y cols, 2004) y pérdida neuronal en el hipocampo (Bilkei-Gorzo y cols, 2005)

2.3.2 Sistema endocannabinoide y mecanismos implicados en la depresión

Se ha demostrado que el sistema endocannabinoide participa en los principales procesos que están implicados en la neurobiología de la depresión. Un elemento integrador de todos estos procesos es la **respuesta al estrés** mediada por el eje HPA, en la regulación del cual el sistema endocannabinoide desempeña una función destacada (Cota, 2008). En condiciones fisiológicas, la señalización endocannabinoide modula negativamente la activación del eje HPA inducida por el estrés (Patel y cols, 2004) mediante la estimulación del receptor CB₁ (Cota y cols, 2007), facilitando así el retorno al equilibrio homeostático. En concordancia con estas observaciones, numerosos estudios han demostrado que el bloqueo farmacológico o genético del receptor CB₁ induce una respuesta exagerada al estrés, caracterizada por niveles elevados de ACTH y glucocorticoides en sangre (Manzanares y cols, 1999; Cota y cols, 2003, 2007; Barna y cols, 2004; Patel y cols, 2004; Urigüen y cols, 2004; Wade y cols, 2006; Steiner y cols, 2008a). El control sobre la retroalimentación de los glucocorticoides ejercido por los endocannabinoides se debe, por un lado, a la inhibición retrógrada de la transmisión glutamatérgica en las neuronas del PVN que contienen CRF (Di y cols, 2003) y por otro a la modulación de la secreción de ACTH en la pituitaria (Cota y cols, 2007). En este sentido, un interesante estudio publicado recientemente demuestra que la hiperactividad del eje HPA en animales carentes del receptor CB₁

se debe a la ausencia de este receptor en las neuronas glutamatérgicas subcorticales (Steiner y cols, 2008b), confirmando con experimentos *in vivo* las evidencias observadas por Di y cols (2003) mediante técnicas electrofisiológicas. Aparte del papel desempeñado en las respuestas inmediatas al estrés, el sistema endocannabinoide participa en las adaptaciones al estrés repetido (Patel y Hillard, 2008). Las alteraciones de la señalización endocannabinoide que facilitan estas adaptaciones se producen a nivel de los ligandos endógenos, específicamente en las áreas cerebrales implicadas en las respuestas al estrés. Patel y Hillard observaron dos patrones diferenciados de alteraciones en los niveles de endocannabinoides. Por un lado, en la corteza prefrontal, la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo observaron una deficiencia en anandamida, que podría tener relación con la aparición de algunos rasgos de tipo depresivo (Kathuria y cols, 2003; Gobbi y cols, 2005), y un incremento de 2-AG, que contribuiría a la habituación neuronal al estrés y que intentaría reducir la excesiva actividad glutamatérgica (Patel y Hillard, 2008). Por otro lado, el estriado ventral presentaba un patrón completamente diferente, con una deficiencia de 2-AG y un incremento de anandamida tras la exposición repetida al estrés (Patel y Hillard, 2008). Los autores propusieron que estos incrementos de anandamida en el estriado ventral podrían intentar compensar el impacto hedónico negativo del estrés, puesto que la señalización de anandamida se ha asociado al incremento de la actividad dopaminérgica mesolímbica (Mahler y cols, 2007).

Como se ha revisado en el Apartado 1.3.2.3, la exposición repetida o intensa al estrés puede alterar los procesos de **neuroplasticidad**, mecanismos fundamentales de adaptación y supervivencia de las neuronas que están alterados en los trastornos depresivos. Numerosas evidencias señalan al sistema endocannabinoide como un importante mediador de la plasticidad sináptica relacionada con las respuestas emocionales (Viveros y cols, 2007). Así, la activación del receptor CB₁ es capaz de mitigar el daño neuronal producido por diferentes situaciones neurotóxicas, como la isquemia (Parmentier-Batteur y cols, 2002) y la excitotoxicidad (Marsicano y cols, 2003). Esta capacidad de recuperación del daño producido por el estrés en situaciones de neurotoxicidad asociada al receptor CB₁ viene mediada por un incremento de los niveles de endocannabinoides (Hansen y cols, 2001; Panikashvili y cols, 2001). Éstos estimularían la síntesis del factor neurotrófico BDNF, que sería uno de los mediadores finales de la protección neuronal asociada a los endocannabinoides (Khaspekov y cols, 2004). Otras evidencias que demuestran la relevancia del receptor CB₁ en la adaptación al estrés son las deficiencias en la plasticidad neuronal observadas en los animales carentes de este receptor. Estos animales

muestran una mayor pérdida neuronal en el hipocampo en edad adulta (Bilkei-Gorzo y cols, 2005), menor tasa de neurogénesis en el giro dentado (Jin y cols, 2004), una reducción de la expresión de BDNF en el hipocampo (Steiner y cols, 2008a) y una deficiencia en la capacidad de extinguir las memorias aversivas (Marsicano y cols, 2002).

Otro de los mecanismos modulados por el sistema endocannabinoide que está involucrado en la fisiopatología de la depresión es el circuito de **motivación y recompensa**. La estimulación del receptor CB₁ por endocannabinoides o agonistas exógenos activa la vía dopaminérgica mesolímbica (Figura 22) produciendo efectos reforzantes y facilitando la motivación por estímulos naturales o drogas de abuso (Maldonado y cols, 2006; Solinas y cols, 2008). Así, la ausencia del receptor CB₁ produce un estado de anhedonia en los ratones similar al observado en pacientes deprimidos (Sanchís-Segura y cols, 2004; Maldonado y cols, 2006).

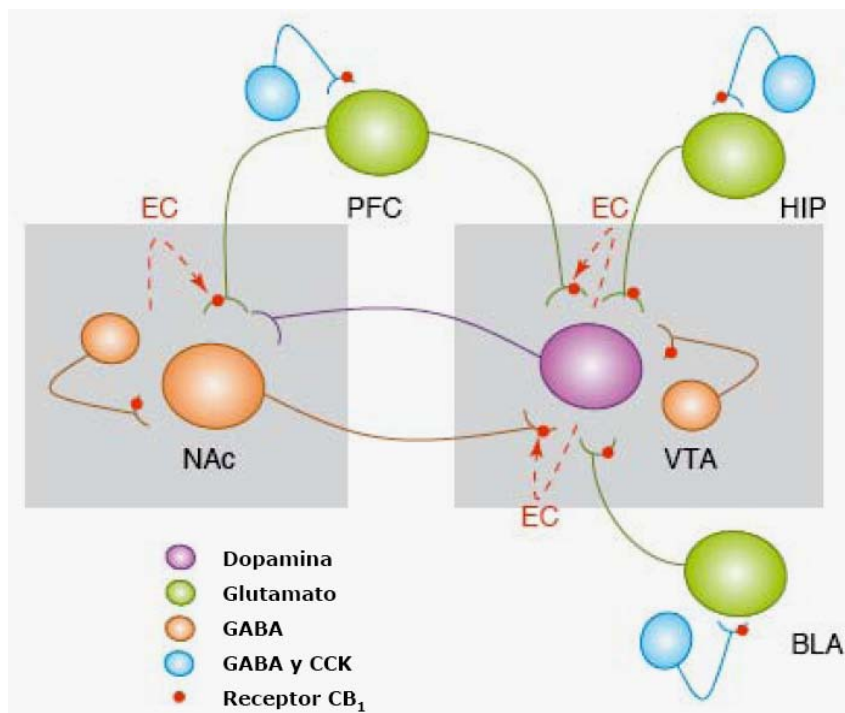


Figura 22. Posibles mecanismos de acción del sistema endocannabinoide en la modulación de los efectos reforzantes. La activación de los receptores CB₁ localizados en las neuronas presinápticas del VTA inhibe la liberación de GABA, facilitando la actividad dopaminérgica. Este incremento de actividad induce la liberación de endocannabinoides en el VTA que de manera retrógrada activan los receptores CB₁ que se encuentran en las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas que proyectan desde la corteza prefrontal (PFC), amígdala basolateral (BLA) e hipocampo (HIP), inhibiendo su acción sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA. Las neuronas glutamatérgicas que proyectan sobre el VTA están igualmente bajo el control de los receptores CB₁ a través del efecto inhibitorio de neuronas presinápticas que liberan GABA y CCK. En el núcleo *accumbens* (NAc) los endocannabinoides activan los receptores CB₁ existentes en los axones de las neuronas glutamatérgicas. La subsiguiente inhibición de la liberación de glutamato inhibe las neuronas GABAérgicas que se originan en el núcleo *accumbens* y proyectan al VTA, activando por tanto indirectamente las neuronas dopaminérgicas del VTA. Adaptado de Maldonado y cols (2006).

Por último, cabe destacar la implicación del sistema endocannabinoide en los **mecanismos de acción** de los compuestos **antidepresivos**. Estas sustancias ejercen su acción terapéutica promoviendo la transmisión serotoninérgica y noradrenérgica, principalmente. Existen diversas evidencias de la participación del sistema endocannabinoide en esta actividad monoaminérgica a diferentes niveles, a pesar de que la naturaleza de la interacción no ha sido totalmente elucidada. Por un lado, se ha observado que los agonistas del receptor CB₁ incrementan la actividad eléctrica de las neuronas en el núcleo del rafe dorsal y en el *locus coeruleus* (Gobbi y cols, 2005) mediante las proyecciones que llegan desde la corteza prefrontal medial (Bambico y cols, 2007), promoviendo la liberación de 5-HT y noradrenalina. En cambio, otros autores han demostrado que la estimulación del receptor CB₁ induce una inhibición de la liberación de 5-HT en el hipocampo y en la corteza frontal (Nakazi y cols, 2000; Egashira y cols, 2002), en consonancia con el hecho de que el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ produzca una estimulación de la liberación de 5-HT (Tzavara y cols, 2003; Darmani y cols, 2003). Por otro lado, los endocannabinoides son necesarios para la correcta señalización asociada a la 5-HT. Así, un estudio reciente demuestra la conexión entre la señalización de los receptores CB₁ y 5-HT₂, que son receptores serotoninérgicos que alteran la excitabilidad de las neuronas y están implicados en los trastornos emocionales (Best y Regehr, 2008). Este trabajo sugiere que la acción de los receptores 5-HT₂ se debería en parte a su capacidad para promover la síntesis y liberación de endocannabinoides, que inducirían retrógradamente una supresión de las sinapsis glutamatérgicas a través de la activación de los receptores CB₁ presinápticos. Aparte de la importancia de la señalización cannabinoide para la correcta actividad de las monoaminas, que es clave en la eficacia de los antidepresivos, también existen evidencias de que el tratamiento con antidepresivos induce alteraciones en algunos componentes del sistema endocannabinoide. En este sentido, el grupo de Hill y Gorzalka demostró que el tratamiento crónico con antidepresivos tricíclicos inducía un incremento en la densidad de los receptores CB₁ en el hipotálamo y en el hipocampo que contribuía a la capacidad de estos antidepresivos para suprimir la activación del eje HPA inducida por el estrés (Hill y cols, 2006a).

3. NICOTINA: ANSIEDAD Y DISFORIA ASOCIADA A LA ABSTINENCIA

3.1 Nicotina y sistema colinérgico

La nicotina es el principal componente psicoactivo del tabaco (Figura 23a) y es la responsable de los efectos estimulantes, el refuerzo, la dependencia y la adicción que resultan de su consumo (Kenny y Markou, 2001). Además, la nicotina ejerce otros efectos en el organismo. Así, se ha descrito que es capaz de modular la neurotransmisión del dolor, el control del movimiento, los procesos cognitivos y también las respuestas de tipo emocional, entre otras (Picciotto y cols, 1995; File y cols, 2002; Decker y cols, 2004; Katner y cols, 2004).

Los efectos farmacológicos de la nicotina tienen lugar a través de la activación de los nAChRs (Figura 23b), que forman parte del sistema colinérgico (Figura 24). Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro y también en la periferia. La diversidad de subtipos de nAChRs y su localización dendrítica, somal, axonal, presináptica y postsináptica contribuye a la variedad de funciones desempeñadas por estos receptores en el sistema nervioso central. Los nAChRs se localizan presinápticos facilitan la liberación de diferentes neurotransmisores como glutamato, GABA, acetilcolina, dopamina, noradrenalina y 5-HT (Wonnacott y cols, 2006). En cambio, los postsinápticos y los no sinápticos influyen en la excitabilidad neuronal así como en la modulación dependiente de actividad de procesos intracelulares que participan en aspectos fundamentales de la plasticidad sináptica implicados en el aprendizaje, la memoria y el desarrollo (Dani y Bertrand, 2007). A nivel periférico los nAChRs se localizan en la placa muscular, en las neuronas vegetativas postganglionares y en la médula adrenal, donde estimulan la neurotransmisión simpática (Haass y Kübler, 1997).

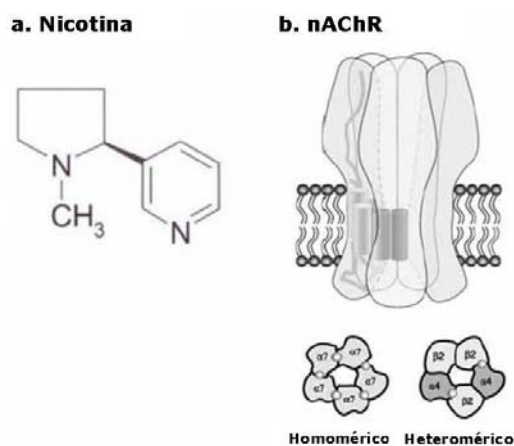


Figura 23. a) Estructura química de la nicotina. B) Esquema representativo de los nAChRs. Adaptado de Hogg y cols (2003).

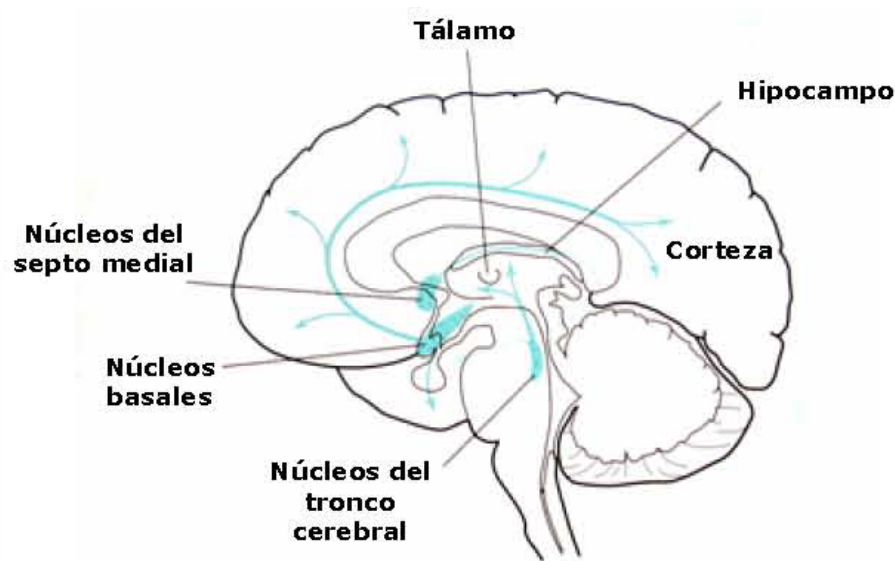


Figura 24. Sistema colinérgico en el cerebro. Adaptado de Nestler y cols (2001).

Los nAChRs pertenecen a la familia de canales iónicos que se activan mediante la unión de un ligando y están compuestos por cinco subunidades de membrana que se combinan para formar diferentes tipos de receptores funcionales (Dani y Bertrand, 2007). Estos receptores se pueden dividir en dos grandes grupos, los de tipo muscular y los de tipo neuronal, en función de la diferente composición de subunidades α , β , γ , δ y ϵ . En el sistema nervioso central, los nAChRs están formados por la combinación de subunidades tipo α y β . Diversos estudios han demostrado que las neuronas expresan nueve tipos de subunidades α (α_2 - α_{10}) y tres tipos de subunidades β (β_2 - β_4). Estas subunidades se pueden combinar de manera homomérica (p.ej. α_7) o heteromérica (p.ej. α_4/β_2) para generar una gran diversidad de subtipos de nAChRs que presentan propiedades funcionales y características farmacológicas diferentes (Hogg y cols, 2003).

Un aspecto importante a destacar de los nAChRs es que pueden existir en cuatro estados funcionales: cerrado, abierto, desensibilizado e inactivo. En general, los nAChRs permanecen largo tiempo en estado cerrado antes de que se una el agonista. Estos receptores se encuentran en estado abierto durante un breve espacio de tiempo cuando el canal está conduciendo cationes y en estado de desensibilización e inactivo cuando no responden a agonistas (Dani y Heinemann, 1996). El porcentaje de tiempo que los nAChRs pasan en cada uno de estos estados depende, entre otras cosas, del tipo de subunidades que los formen y de la presencia de agonistas. Así, se ha demostrado que en el VTA los nAChRs que contienen la subunidad α_7 se desensibilizan menos ante la presencia de nicotina que aquellos que no contienen esta subunidad (Mansvelder y McGehee, 2002).

3.2 Nicotina y ansiedad

La nicotina es capaz de reducir la ansiedad y aliviar el estrés de los fumadores (Pomerleau y Pomerleau, 1990), siendo esta capacidad un motivo que influye sobre la cronificación del consumo. Sin embargo, estudios realizados con animales de experimentación han demostrado que los efectos de la nicotina sobre los niveles de ansiedad son complejos y bifásicos, pudiendo inducir un incremento o una disminución de los niveles de ansiedad. La habilidad de la nicotina como agente ansiolítico o ansiogénico depende del régimen de administración (agudo, crónico o durante la abstinencia), la dosis, la vía de administración (inhalación, intraperitoneal, subcutánea o intravenosa) y del estado previo de los animales de experimentación (basal, estresado o durante la abstinencia). De igual modo, la nicotina modula los niveles de ansiedad de los consumidores de forma diferente en función de si se trata de fumadores experimentados o noveles. Se postula que esta complejidad se debe al elevado número de nAChRs con diferentes características que pueden ser activados simultáneamente y a la diversidad de neurotransmisores que serían liberados en diferentes áreas cerebrales como consecuencia de la acción de la nicotina (Picciotto y cols, 2002). De esta manera, el resultado final de la administración de la nicotina sería la suma de los efectos de todos esos neurotransmisores en conjunto.

A pesar de la dificultad en desentrañar la complejidad de la acción de la nicotina sobre la ansiedad, existen evidencias que demuestran la mayor implicación de algunos neurotransmisores en estas respuestas. Así, estudios farmacológicos sugieren que la transmisión serotoninérgica sería particularmente importante en las propiedades ansiogénicas de la nicotina (Cheeta y cols, 2000; File y cols, 2000), de la misma forma que lo sería la señalización GABAérgica en la acción ansiolítica de la misma (O'Neill y Brioni, 1994).

3.3 Síndrome de abstinencia de nicotina

El consumo repetido de nicotina induce un estado de dependencia física que conlleva la aparición de un síndrome de abstinencia cuando se interrumpe este consumo (Kenny y Markou, 2001). En humanos, el síndrome de abstinencia de nicotina comprende tanto síntomas físicos como motivacionales. La sintomatología física más representativa incluye bradicardia, malestar gastrointestinal y un aumento considerable del apetito. Dichos síntomas se acompañan de un estado de ansiedad, irritabilidad, disforia y dificultad en la concentración (Hughes, 2007). En el animal de experimentación, el síndrome de abstinencia de nicotina puede aparecer espontáneamente después de finalizar un tratamiento crónico con

nicotina o puede precipitarse de forma brusca mediante la administración de antagonistas nicotínicos (Damaj y cols, 2003). Análogamente al síndrome de abstinencia en humanos, el descrito en roedores se caracteriza por la aparición de signos físicos y motivacionales. En la actualidad, disponemos de modelos de experimentación en animales que reproducen tanto los aspectos físicos como las manifestaciones emocionales del síndrome de abstinencia de nicotina. Los signos físicos más representativos de la abstinencia de nicotina en roedores incluyen contracciones de la musculatura abdominal y facial, movimientos compulsivos de rascado, intentos de escape, lameteo de los genitales, temblores y estremecimientos (Isola y cols, 1999; Watkins y cols, 2000). Por otro lado, la sintomatología emocional de tipo disfórico asociada a la abstinencia de nicotina se ha puesto de manifiesto en roedores mediante modelos de autoestimulación intracraneal y de aversión de plaza condicionada. Así, mediante técnicas de estimulación intracraneal se ha podido observar que el síndrome de abstinencia de nicotina, tanto espontáneo como precipitado por antagonistas nicotínicos, produce un aumento de los umbrales del refuerzo cerebral en ratas (Epping-Jordan y cols, 1998; Watkins y cols, 2000). De la misma forma, se ha demostrado que ratas dependientes de nicotina manifiestan una aversión hacia el lugar donde han sido condicionadas a la abstinencia de nicotina inducida por la administración de un antagonista nicotínico u opioide (Watkins y cols, 2000).

A nivel bioquímico, el síndrome de abstinencia de nicotina en ratas se ha asociado con un aumento de la actividad adenilato ciclasa y de la expresión de c-fos en la amígdala (Tzavara y cols, 2002; Panagis y cols, 2000), así como una disminución de la liberación de dopamina en la amígdala y en el núcleo *accumbens* (Hildebrand y cols, 1998; Panagis y cols, 2000).

3.4 Interacción con el sistema cannabinoide

Diversos indicios sugieren que el sistema endocannabinoide participa en algunas propiedades farmacológicas de la nicotina. Esta interacción entre el sistema endocannabinoide y el colinérgico cobra un especial interés si tenemos en cuenta la asociación frecuente del consumo de tabaco y cannabis. Los principales compuestos psicoactivos que contienen ambas sustancias, la nicotina y el Δ^9 -THC respectivamente, son capaces de afectar funciones cerebrales similares como la locomoción, la nocicepción, la ansiedad, el aprendizaje y la memoria. De la misma forma, tanto el Δ^9 -THC como la nicotina son capaces de inducir efectos gratificantes y dependencia física. Además, la amplia distribución de los receptores cannabinoides CB₁ y nAChRs en el sistema nervioso central sugiere que puede

existir una interacción funcional entre estos dos sistemas, puesto que ambos receptores colocalizan en numerosas áreas.

Así, existen evidencias que demuestran una interacción entre la nicotina y los agonistas cannabinoídes a nivel de las respuestas agudas. La nicotina es capaz de facilitar, en el animal de experimentación, diversas respuestas comportamentales inducidas tras la administración aguda de cannabinoídes tales como la hipolocomoción, ansiolisis, hipotermia, incoordinación motora y bradicardia (Pryor y cols, 1978; Valjent y cols, 2002). Asimismo, la administración conjunta de dosis sub-efectivas de Δ^9 -THC y nicotina produce una respuesta de tipo ansiolítico (Valjent y cols, 2002). En este mismo trabajo, Valjent y colaboradores observaron que el efecto facilitador de la nicotina sobre las respuestas del Δ^9 -THC podría estar relacionado con el incremento de los niveles de expresión de c-fos en el núcleo *accumbens*, núcleo central y basolateral de la amígdala, núcleo del lecho de la estría terminal y PVN inducido por la administración conjunta de Δ^9 -THC y nicotina. Además, diversos estudios han revelado la participación del sistema endocannabinoide en las propiedades reforzantes y adictivas de la nicotina (Castañé y cols, 2005). En este sentido, en una primera aproximación Valjent y cols (2002) demostraron que dosis subefectivas de Δ^9 -THC y de nicotina eran capaces de inducir efectos reforzantes evaluados en el paradigma del condicionamiento espacial. Utilizando este mismo paradigma, Castañé y cols (2002) revelaron que los animales carentes del receptor CB₁ no eran capaces de manifestar una preferencia de lugar inducida por los efectos reforzantes de la nicotina. Igualmente, observaron que la severidad del síndrome de abstinencia de nicotina en estos ratones mutantes estaba mantenida (Castañé y cols, 2002), lo que sugirió que el sistema endocannabinoide podría participar en los aspectos motivacionales de la nicotina, a través del receptor CB₁, pero no en las manifestaciones físicas de la dependencia. Un estudio reciente confirma los resultados obtenidos por Castañé y cols con los ratones mutantes para el receptor CB₁ (Merritt y cols, 2008) y aporta información adicional sobre el papel desempeñado por los endocannabinoídes en las propiedades reforzantes de la nicotina. En este trabajo, demuestran que el bloqueo farmacológico o genético de la FAAH, que induce un incremento de los niveles de anandamida, potencia los efectos reforzantes de la nicotina aunque también incrementa las manifestaciones físicas y afectivas de la abstinencia de nicotina mediante la activación de receptores diferentes al CB₁ (Merritt y cols, 2008). Adicionalmente, el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ ha sido otra aproximación experimental que ha permitido dilucidar la participación del sistema endocannabinoide en las propiedades adictivas de la nicotina. El antagonista cannabinoide rimonabant

redujo la autoadministración de nicotina y el comportamiento de búsqueda compulsiva de la droga en ratas (Cohen y cols, 2005). Del mismo modo, el rimonabant bloqueó la preferencia de lugar inducida por los efectos reforzantes de la nicotina (Forget y cols, 2006), indicando una vez más que los efectos motivacionales de la nicotina están relacionados con la actividad endocannabinoide. Estas observaciones han llevado a plantear el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ como tratamiento para la dependencia de la nicotina (Le Foll y cols, 2008). Se han desarrollado ensayos clínicos en los que se ha demostrado la eficacia del rimonabant para cesar el consumo de nicotina, a pesar de que la aparición de efectos secundarios relevantes, como el incremento del riesgo de depresión y suicidio, han desestimado su aprobación (Cahill y Ussher, 2007).

Por otro lado, estudios bioquímicos han demostrado que el tratamiento crónico con nicotina modifica los niveles de endocannabinoides en determinadas áreas cerebrales. Concretamente, se ha observado un incremento de los niveles de anandamida en áreas del sistema límbico y una disminución de este endocannabinode en el hipocampo, estriado y corteza cerebral (González y cols, 2002). En cambio, la densidad del receptor CB₁ no se modificó con un tratamiento crónico con nicotina (González y cols, 2002). Estos resultados, junto con los datos farmacológicos anteriormente descritos, sugieren que la acción de los cannabinoides endógenos participaría en los efectos producidos por la nicotina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

Los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral son analizar el papel desempeñado por el sistema endocannabinoide en los trastornos emocionales de tipo depresivo y en el síndrome de abstinencia y la ansiedad asociados al consumo de nicotina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la respuesta emocional a nivel comportamental de los animales carentes del receptor CB₁ en respuesta al estrés.
- Analizar el papel de los factores neurotróficos en las respuestas de tipo emocional de los animales carentes del receptor CB₁ expuestos a una situación de estrés.
- Investigar la interacción entre el sistema endocannabinoide y el sistema serotoninérgico a nivel de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} mediante el análisis de la funcionalidad de estos receptores en animales carentes del receptor CB₁.
- Estudiar el efecto de la ausencia de actividad del receptor CB₁ en diferentes componentes el sistema serotoninérgico que regulan la transmisión serotoninérgica y que están implicados en las respuestas emocionales.
- Analizar la participación del sistema endocannabinoide en las manifestaciones físicas y afectivas de la abstinencia de la nicotina en el ratón.
- Evaluar la participación del sistema endocannabinoide en los efectos inducidos por la nicotina sobre la ansiedad en el ratón.

RESULTADOS

ARTÍCULO 1

BDNF impairment correlates with depressive-like behavior in CB₁ cannabinoid knockout mice.

Aso E, Ozaita A, Valdizán EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O
J Neurochem, (2008) 105(2):565-72.

OBJETIVOS:

Analizar el papel de los factores neurotróficos en las respuestas de tipo emocional de los animales carentes del receptor CB₁ expuestos a una situación de estrés.

RESULTADOS DESTACADOS:

- Los animales carentes del receptor CB₁ manifestaron un fenotipo de tipo depresivo que se evidenció por un mayor tiempo de inmovilidad en el test de suspensión de la cola, lo cual es considerado como un comportamiento de desespero ante una situación estresante.
- Los niveles de corticosterona fueron más elevados en los animales mutantes en respuesta al estrés.
- Se observó una disminución de los niveles del factor neurotrófico BDNF en el hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁ a nivel basal y tras la exposición al estrés.
- La administración local de BDNF en el hipocampo revirtió el fenotipo de tipo depresivo observado en el test de suspensión de la cola en los animales mutantes.

CONCLUSIÓN:

La ausencia del receptor CB₁ produce una respuesta incrementada al estrés y una deficiencia en los niveles de BDNF en el hipocampo. Ambos efectos están relacionados con un fenotipo de tipo depresivo en el ratón.

Aso E, Ozaita A, Valdizán EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O.

[*BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice.*](#)

J Neurochem. 2008 Apr;105(2):565-72. Epub 2007 Nov 28.

ARTÍCULO 2

CB₁ knockout mice display impaired functionality of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors

Mato S, Aso E, Castro E, Martín M, Valverde O, Maldonado R, Pazos A
J Neurochem, (2007) 103(5):2111-20.

OBJETIVOS:

Investigar la interacción entre el sistema endocannabinoide y el sistema serotoninérgico a nivel de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} mediante el análisis de la funcionalidad de estos receptores en animales carentes del receptor CB₁.

RESULTADOS:

- Los animales carentes del receptor CB₁ manifestaron una reducción en los efectos hipotérmicos inducidos por el agonista 5-HT_{1A} (\pm)-8-OH-DPAT y en el número de sacudidas de cabeza y temblor de patas inducidos por el agonista 5-HT_{2A/2C} (\pm) DOI.
- La exposición al test de suspensión de la cola reveló un incremento en la conducta de desespero en los animales carentes del receptor CB₁ respecto a los animales control, pero una respuesta similar de ambos genotipos al tratamiento con los antidepresivos fluoxetina e imipramina.
- No se observaron diferencias entre genotipos en la densidad de los sitios de unión de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} en ninguna de las áreas cerebrales analizadas por autorradiografía.
- En los animales carentes del receptor CB₁ se observó una disminución de la capacidad de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} para acoplarse a las proteínas G en el área CA1 del hipocampo y en la corteza fronto-parietal, respectivamente.

CONCLUSIÓN:

Los animales carentes del receptor CB₁ manifiestan una deficiencia en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C}.

Mato S, Aso E, Castro E, Martín M, Valverde O, Maldonado R, Pazos A.
[*Cb1* knockout mice display impaired functionality of 5-HT1A and 5-HT2A/C receptors.](#)
J Neurochem. 2007 Dec;103(5):2111-20. Epub 2007 Oct 18.

ARTÍCULO 3

Lack of CB₁ receptor activity deregulates serotonergic neurotransmission

Aso E, Renoir T, Mengod G, Ledent C, Hamon M, Maldonado R, Lanfumey L, Valverde O

Enviado

OBJETIVOS:

Analizar el efecto del bloqueo del receptor CB₁ en diferentes componentes del sistema serotoninérgico, como los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} o el 5-HTT, que regulan la transmisión serotoninérgica y que están implicados en las respuestas emocionales.

RESULTADOS:

- Los animales carentes del receptor CB₁ presentaron niveles extracelulares de 5-HT basales más altos que sus correspondientes controles en la PFC. En cambio, el incremento de 5-HT en respuesta al tratamiento con fluoxetina en estos animales fue menor.
- El bloqueo genético y farmacológico del receptor CB₁ indujo una desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} presinápticos, caracterizada por una menor capacidad de los agonistas 5-HT_{1A} para inhibir la actividad de las neuronas serotoninérgicas localizadas en el DRN.
- La PFC y el hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁ presentaron una menor densidad de 5HTT.
- Se observó una disminución de la expresión del receptor 5-HT_{2C} en áreas cerebrales implicadas en el control emocional, como el DRN, el NAcc y el PVN, en los animales carentes del receptor CB₁. En cambio, estos animales presentaban una regulación al alza de la expresión del receptor 5-HT_{2C} en el hipocampo ventral.

CONCLUSIÓN:

La ausencia de actividad del receptor CB₁ induce alteraciones en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} y del 5-HTT que producen un incremento de los niveles extracelulares de 5-HT.

Lack of CB₁ receptor activity deregulates serotonergic neurotransmission.

Ester Aso¹, Thibault Renoir², Guadalupe Mengod³, Catherine Ledent⁴, Michel Hamon², Rafael Maldonado⁵, Laurence Lanfumey², Olga Valverde^{1*}

¹Grup de Recerca de Neurobiologia del Comportament (GRNC) and ⁵Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, PRBB, Barcelona, Spain

²INSERM UMR 677, Faculté Médecine La Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris, France

³Department of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁴IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, Brussels B-1070, Belgium

*Corresponding author:

Olga Valverde, Grup de Recerca de Neurobiologia del Comportament, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, PRBB, C/ Doctor Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain. Phone: +34-93-3160867; Fax: + 34-93-3161901; E-mail: olga.valverde@upf.edu

Abbreviations: 5-hydroxytryptamine or serotonin (5-HT), 5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT), cannabinoid receptor 1 (CB₁), dorsal raphe nucleus (DRN), prefrontal cortex (PFC)

Abstract

Serotonergic and endocannabinoid systems are important substrates for the control of emotional behaviour and growing evidence show an involvement in the pathophysiology of mood disorders. In the present study, the absence of the activity of the CB₁ cannabinoid receptor induced a deregulation of 5-HT neurotransmission in mice. Thus, *in vivo* microdialysis experiments revealed increased basal 5-HT extracellular levels in the prefrontal cortex of CB₁ knockout mice, whereas fluoxetine produced a decrease in the 5-HT response in those mutants. These observations could be related to the significant reduction in the 5-HTT binding site density detected in frontal cortex and hippocampus of CB₁ knockout mice. The lack of CB₁ receptor also altered some 5-HT receptors related to the 5-HT feedback. Extracellular recordings in the dorsal raphe nucleus revealed that the genetic and pharmacological blockade on CB₁ receptor induced a 5-HT_{1A} autoreceptor functional desensitization. *In situ* hybridisation studies showed a reduction in the expression of the 5-HT_{2C} receptor within several brain areas related to the control of the emotional responses such as the dorsal raphe nucleus, the nucleus *accumbens* and the paraventricular nucleus of the hypothalamus, whereas an overexpression was observed in the CA3 area of the ventral hippocampus. These results reveal that the lack of CB₁ receptor induces a facilitation of the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus by altering different components of the 5-HT feedback as well as an increase in the release of 5-HT in the prefrontal cortex in mice.

Keywords: 5-HT, CB₁ cannabinoid receptor, 5-HTT, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}

Running title: 5-HT activity in CB₁ KO mice

Introduction

The serotonergic system has been related to the control of emotional responses and the impairment of serotonin (5-HT) neurotransmission has been classically associated to the pathophysiology of mood disorders. Thus, some pharmacological agents that increase 5-HT synaptic levels exhibit antidepressant properties (Artigas et al, 2002; Nutt et al, 2002). 5-HT neurons are mainly located within the raphe nuclei. 5-HT is released from the terminals that project to multiple brain regions to regulate several behaviours, including cognition and mood. The removal of 5-HT from the synaptic cleft is carried out by a single protein, the 5-HT transporter (5-HTT). The 5-HTT determines the size and duration of the serotonergic responses, playing a key role in serotonergic neurotransmission (Lesch and Mössner, 2006). Up to 14 pre- and post-synaptic 5-HT receptors have been identified, which mediate 5-HT responses (Nichols and Nichols, 2008). 5-HT pre- and post-synaptic receptors also display a regulatory action on the serotonergic activity. Accordingly, the somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor negatively controls cell firing and impulse-dependent 5-HT release of serotonergic neurons whereas the axonal 5-HT_{1B} receptor controls 5-HT synthesis and release at terminal level (Barnes and Sharp, 1999). Similarly, some post-synaptic receptors such as 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors, also participate in the inhibition of 5-HT neurons activity (Hajós et al, 1999; Boothman et al, 2003). Among all these post-synaptic receptors, growing attention has been addressed toward understanding the role of 5-HT_{2C} receptor in the regulation of emotional state beyond the involvement in 5-HT feedback regulation. This receptor plays an essential role in the 5-HT-induced HPA axis activation (Heisler et al, 2007) and also mediates the inhibition of dopaminergic system, a key component for hedonia and motivation (Dremencov et al, 2006).

Endocannabinoid system is one of the major neuromodulatory systems of the brain and previous studies revealed its contribution on maintaining the homeostasis of various states including mood and emotion (Valverde, 2005; Moreira and Lutz, 2008). In fact, the pharmacological and genetic blockade of the cannabinoid CB₁ receptor induces a phenotypic state analogous to depression in experimental animals (Hill and Gorzalka, 2005; Aso et al, 2008). Therefore, CB₁ knockout mice exhibit depressive-like symptoms such as reduced responsiveness to reward stimuli (Sánchez-Segura et al, 2003; Maldonado et al, 2006), altered neurovegetative functions (Cota et al, 2003), deficits in extinction of aversive memories (Marsicano et al, 2002) and higher anxiety levels and sensitivity to stress than control animals (Martín et al, 2002; Aso et al, 2008). The role of endocannabinoid system in regulating emotions and mood could be provided by the modulation of neurotransmitter release, including 5-HT, exerted by CB₁ receptors (Tzavara et al, 2003; Szabo and Schlicker, 2005; Bambico et al, 2007). The interaction between 5-HT and endocannabinoid systems is also sustained by the fact that 5-HT is able to evoke endocannabinoid release (Best and Regehr, 2008). However, further investigations are needed to better understand the interaction between the endocannabinoid system and the different components of the serotonergic system in the modulation of mood and emotions. In this study, we therefore aimed to investigate the role of endocannabinoid system in the regulation of 5-HT neurotransmission by assessing the functionality of some serotonergic components involved in 5-HT feedback in the absence of CB₁ receptor.

Materials and methods

Animals

The experiments were carried out in male CB₁ knockout mice and wild-type littermates 8-12 weeks old at the beginning of the experiments. The generation of mice lacking CB₁ cannabinoid receptor was described previously (Ledent et al, 1999). In order to homogenize the genetic background of mice, the first generation heterozygous was bred for 30 generations on a CD1 background, with selection for the mutant CB₁ gene at each generation. After the 30th generation of backcross, heterozygote-heterozygote mating of CB₁ knockout mice produced wild-type and knockout littermates for subsequent experiments. All animals used in a given experiment were matched for age and weight. Mice were housed five per cage in a temperature (21 ± 1°C) and humidity-controlled (55 ± 10%) room with a 12:12-h light/dark cycle (light between 08:00 and 20:00 h) with food and water *ad libitum*. Animal procedures were conducted according to ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Local Ethical Committee (PRBB).

Drugs

The selective 5-HT reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine hydrochloride was supplied by Sigma[®] Chemical Co (Madrid, Spain). Fluoxetine was dissolved in distilled water and injected intraperitoneally (i.p.) in a volume of 10 mL/kg body weight. The CB₁ receptor antagonist, rimonabant, was kindly provided by Sanofi-Aventis (Bagneux, France). Rimonabant was emulsified in two drops of Tween 80 and then suspended in saline for i.p. administration in a volume of 10 mL/kg body weight. The 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone was purchased by Bayer-Troponwerke (Cologne, Germany).

***In vivo* microdialysis procedure**

Mice were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (0.2 mL/10 g body weight i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus with a flat skull (Paxinos and Franklin, 1997). A small hole was drilled on the skull and a 2 mm analytical probe (CMA/7/2 mm, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) was implanted directly in the prefrontal cortex (PFC) (AP, +2.1 mm; ML, \pm 0.5 mm; DV, -3.0 mm from bregma) and then fixed to the skull with dental cement, as described (Trigo et al, 2007). One day after probe implantation, animals were habituated to the experimental environment overnight. The following morning, a Ringer solution was pumped through the dialysis probe (NaCl, 148 mM; KCl, 2.7 mM; CaCl₂, 1.2 mM and MgCl₂, 0.8 mM, pH 6.0) at a constant rate of 1 μ L/min. Five consecutive 18-min dialysis samples were collected for the determination of baseline 5-HT levels. Then, mice were injected with saline or fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) and collection of samples was continued for 4 h following injection. Dialysates (15 μ L) were injected without any purification into a high performance liquid chromatography (HPLC) system that consisted of a pump linked to an automatic injector (Agilent 1100, Palo Alto, USA), a reverse-phase column (Zorbax SB C18, 3.5 μ m, 150 \times 4.6 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) and a coulometric detector (Coulchem II, ESA, Chelmsford, USA) with a 5011A analytical cell. 5-HT was quantified as described (Trigo et al, 2007). Briefly, the first electrode was fixed at + 50 mV and the second electrode at +300 mV. The gain of the detector was set at 10 nA. The composition of the mobile phase was 50 mM sodium acetate, 0.1 mM Na₂EDTA, 0.65 mM octane sulfonic acid sodium salt and 24% (vol/vol) methanol, pH 5.0. The flow rate was set at 0.8 mL/min and the sensitivity of the assay for 5-HT was 0.3 pg/15 μ L. Percentage of 5-HT concentrations after either fluoxetine or saline

challenge respect to basal concentrations were converted to area under the curve (AUC) using a standard trapezoid method (Gibaldi and Perrier, 1975). The following equation was used: $AUC = [0.5*(B + C_1)*d + 0.5*(C_1 + C_2)*d + 0.5*(C_2 + C_3)*d + \dots + 0.5*(C_{n-1} + C_n)*d]$, where B is the average basal value, C_1 to C_n are values during drug challenge, and d is the duration of the sample (18 min in this case). At the end of the experiments, animals were sacrificed, and brains were quickly removed and stored at -80°C . To check the position of the probe, brains were cut using a cryostat in 20 μm serial coronal sections, which were then processed with Cresyl Violet and observed under a microscope. Only those animals with correct probe placements were used in the study.

[^3H]Citalopram binding onto brain membranes

Dissected tissues (anterior raphe area, hippocampus, striatum and cerebral cortex) were homogenized in 40 vol (w/v) of ice-cold Tris-salt buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) using a Polytron. Homogenates were centrifuged at 40,000 g for 20 min, the pellets were suspended in 40 vol of the same buffer and incubated at 37°C for 10 min to remove endogenous 5-HT. The membranes were spun down at 40,000 g for 20 min and washed another three times by suspension/centrifugation as before. The final pellet was suspended in 10 vol of the same buffer and 25 μL aliquots were mixed with 225 μL of fresh Tris-salt buffer, pH 7.4, containing [^3H]citalopram (83.0 Ci/mmol; 2 nM final concentration) in an Optiplate 96-well apparatus (Perkin Elmer, Wellesley, MA) for a 1 h incubation at room temperature. Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μM fluoxetine. After the incubation, the unifilter GF/B plate was drained with a FilterMate harvester (Perkin Elmer) and each well was washed three times with 500 μL of ice-cold buffer. Microscint-40 scintillation cocktail

(30 μ L) was added to each well of the plate, and radioactivity was counted using a TopCount scintillation counter (Perkin Elmer). The specific binding (expressed as cpm/10 μ g protein) was obtained by subtracting non-specific binding from total binding. Proteins were quantified using the method of Lowry et al (1951) with bovine serum albumin as standard.

Electrophysiological experiments

Immediately after removal from the skull, brains were immersed in an ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (NaCl 126 mM, KCl 3.5 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 1.3 mM, CaCl_2 2.0 mM, NaHCO_3 25 mM, D-glucose 11 mM), continuously bubbled with carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) to maintain pH value at 7.3. A block of tissue containing the dorsal raphe nucleus (DRN) was cut into sections (400 μ m thick) in the same aCSF using a vibratome. Brainstem slices were immediately immersed in oxygenated aCSF at room temperature (22 $^\circ\text{C}$). A single slice was then placed on a nylon mesh, completely submerged in the recording chamber and continuously superfused with oxygenated aCSF (34 $^\circ\text{C}$) at a constant flow rate of 2–3 mL/min. Extracellular recordings of the firing of DRN serotonergic neurons were made using glass microelectrodes filled with 2 M NaCl (12–15 $\text{M}\Omega$). Cells were identified as 5-HT neurons according to previously described criteria (Lanfumeu et al, 1999). Firing was evoked in the otherwise silent neurons by adding the α_1 adrenoceptor agonist phenylephrine (3 μ M) into the superfusing aCSF (VanderMaelen and Aghajanian 1983). Electrical signals were fed into a high-input impedance amplifier (VF 180, BioLogic, Claix, France), an oscilloscope and an electronic ratemeter triggered by individual action potentials, connected to an A/D converter and a personal computer. Using dedicated software, the integrated firing rate was recorded, computed, and displayed on a chart recorder as

consecutive 10-s samples. Baseline activity was recorded for at least 10 min prior to perfusion of drugs into the chamber, via a three-way tap system. Because complete exchange of fluids occurred within 2 min following the arrival of a new solution into the chamber, the duration of each drug application was 3 min. The effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone were evaluated by comparing the mean discharge frequency during the 2 min prior to its application with that recorded at the peak action of the drug, i.e. 2–3 min after its removal from the perfusing aCSF. Data are expressed as percentages of the baseline firing rates.

Pharmacological treatment

The CB₁ receptor antagonist, rimonabant, and its vehicle were administered i.p. (3 mg/kg) once a day (6:00 p.m.) during 2 weeks to two different groups of wild-type mice. Animals were sacrificed and brains removed for the electrophysiological experiments 18h after the last rimonabant injection.

***In situ* hybridization**

The protocols for *in situ* hybridization were based on previously described procedures (Serrats et al, 2005). Briefly, oligonucleotides [complementary to 1100–1147 bases of the rat 5-HT_{2C} receptor cDNA (GenBank acc. no. U35315)] were 3'-end-labeled with [³³P]α-dATP (>2500 Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, USA) using terminal deoxynucleotidyltransferase (Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA) purified by using QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The specificity of the probe has been previously established and published elsewhere (Pompeiano et al, 1994). Frozen tissue sections were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS: 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6

mM KCl), washed in PBS and incubated for 2 min in a fresh solution of predigested pronase (Calbiochem, San Diego, USA). The enzymatic activity was stopped by immersion for 30 s in 2 mg/mL glycine in PBS. Tissues were finally rinsed in PBS and dehydrated. The radioactively labeled probe (1.5 nM) was dissolved in the hybridization buffer, containing 50% formamide, SSC (600 mM NaCl, 60 mM sodium citrate), Denhardt's solution (0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% bovine serum albumine), 10% dextran sulphate, 1% sarkosyl, 20 mM phosphate buffer pH 7.0, 250 mg/mL yeast tRNA and 500 mg/mL salmon sperm DNA. Tissue sections were covered with hybridization buffer, overlaid with Nescofilm coverslips (Bando Chemical Ind., Kobe, Japan) and incubated overnight at 42 °C in humid boxes. The sections were then washed in a buffer, containing 0.6 M NaCl and 10 mM Tris (pH 7.5) at 60 °C they were dried in an ethanol series. For film autoradiography, the hybridized slides were exposed to Biomax-MR films (Kodak) for 66h at -80°C with intensifying screens. Film autoradiograms were scanned with the GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The average densities of 5-HT_{2C} mRNA in different brain regions was evaluated semiquantitatively with Quantity One 4.6.3 software (Bio-Rad Laboratories).

Statistical analyses

All data are given as means \pm SEM. *In vivo* microdialysis data were analyzed using three-way ANOVA with treatment (saline and fluoxetine) and genotype (wild-type and CB₁ knockout) as between-subjects factors and time after fluoxetine injection as within-subjects factor and subsequent two-way ANOVA with genotype and treatment as between-subjects factors, followed by one-way ANOVA, when required. AUC values were compared by using a between-subjects two-way ANOVA (genotype and

treatment), followed by one-way ANOVA for individual differences when required. Extracellular recordings were analyzed by between-subjects two-way ANOVA (ipsapirone concentration and genotype/chronic treatment) followed by Bonferroni's post hoc *t* test. Nonlinear regression was carried out using Prism 4.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) for the calculation of EC₅₀ values of the drugs. Finally, 5-HTT binding and 5-HT_{2C} receptor expression quantification were analyzed by one-way ANOVA (genotype). In all the experiments, the significance level was set at $p < 0.05$.

Results

5-HT extracellular levels in the PFC at basal conditions and after fluoxetine administration

In vivo microdialysis procedure revealed a significant increase of basal 5-HT extracellular levels in the PFC of CB₁ knockout compared to wild-type mice ($F_{(1, 50)} = 4.225$, $p < 0.05$) (Fig 1A). Consequently, the further 5-HT extracellular levels measure in response to fluoxetine treatment was expressed as the percentage respect to the basal values for each genotype.

Fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) induced an increase in 5-HT extracellular levels in the PFC in both genotypes, although the CB₁ knockout mice response was lower than wild-type animals (Fig 1B). Three-way ANOVA showed a significant main effect of time ($F_{(11, 132)} = 1.975$, $p < 0.05$) and treatment ($F_{(1, 12)} = 26.668$, $p < 0.001$), without genotype effect after fluoxetine or saline injection. A significant interaction between time and treatment ($F_{(11, 132)} = 2.102$, $p < 0.05$) was revealed, but no other two- or three-way interactions between factors were observed. Two-way ANOVA (genotype and treatment) indicated a significant genotype effect 18 min and 144 min after fluoxetine or saline administration ($F_{(1, 22)} = 4.808$, $p < 0.05$; $F_{(1, 22)} = 4.376$, $p < 0.05$, respectively) and treatment effect 36 min ($F_{(1, 21)} = 15.071$, $p < 0.001$), 54 min ($F_{(1, 22)} = 26.213$, $p < 0.001$), 72 min ($F_{(1, 20)} = 36.753$, $p < 0.001$), 90 min ($F_{(1, 23)} = 41.090$, $p < 0.001$), 108 min ($F_{(1, 21)} = 27.412$, $p < 0.001$), 126 min ($F_{(1, 19)} = 25.518$, $p < 0.001$), 144 min ($F_{(1, 22)} = 28.262$, $p < 0.001$), 162 min ($F_{(1, 21)} = 36.343$, $p < 0.001$), 180 min ($F_{(1, 20)} = 38.684$, $p < 0.001$), 198 min ($F_{(1, 22)} = 32.420$, $p < 0.001$) and 216 min ($F_{(1, 20)} = 24.619$, $p < 0.001$) after fluoxetine or saline administration. Significant interaction between both genotype and treatment was observed 108 min and 144 min after fluoxetine or saline

administration ($F_{(1, 21)} = 7.545$, $p < 0.05$; $F_{(1, 22)} = 4.660$, $p < 0.05$, respectively). Subsequent one-way ANOVA (genotype) showed a reduction in the percentage of increase of the 5-HT extracellular levels in CB₁ knockout mice respect to wild-type littermates 108 min, 126 min and 144 min after the fluoxetine administration ($F_{(1, 14)} = 10.877$, $p < 0.01$; $F_{(1, 13)} = 8.885$, $p < 0.05$; $F_{(1, 14)} = 8.052$, $p < 0.05$, respectively). Figure 1C represents the AUC values for percentage of 5-HT extracellular levels after fluoxetine or saline administration respect to basal values. Two-way ANOVA revealed treatment effect ($F_{(1, 23)} = 64.719$, $p < 0.001$), no genotype effect, and a significant interaction between these two factors ($F_{(1, 23)} = 7.270$, $p < 0.05$). Subsequent one-way ANOVA (treatment) revealed a significant effect of fluoxetine in wild-type mice ($F_{(1, 12)} = 41.417$, $p < 0.001$) and in CB₁ knockout mice ($F_{(1, 11)} = 27.998$, $p < 0.001$). Comparisons between genotypes indicated no differences after saline treatment but lower AUC value in mutant than in wild-type mice after fluoxetine treatment ($F_{(1, 14)} = 7.575$, $p < 0.05$).

Decreased 5-HTT binding site density in frontal cortex and hippocampus of CB₁ knockout mice

One-way ANOVA revealed a significant decrease of the 5-HTT binding site density in the frontal cortex ($F_{(1, 19)} = 5.960$, $p < 0.05$) and in the hippocampus ($F_{(1, 19)} = 18.906$, $p < 0.001$) of CB₁ knockout compared to wild-type. No differences between genotypes were observed either in the striatum or in the anterior raphe (Fig 2).

5-HT_{1A} functional desensitization in the absence of CB₁ activity

Extracellular recordings were made from serotonergic neurons of the DRN in slices preparations of brains from CB₁ knockout and wild-type mice. Two-way ANOVA

revealed a significant ipsapirone concentration-dependent inhibition ($F_{(7, 140)} = 119.980$, $p < 0.001$) and a significant genotype effect ($F_{(1, 140)} = 7.120$, $p < 0.01$) on the firing of serotonergic neurons, without interaction between ipsapirone and genotype (Fig 3A). However, Bonferroni's post hoc t test indicated a significant difference between genotypes at the ipsapirone 60 nM and 100 nM concentrations ($p < 0.05$, respectively). Indeed, the concentration–response curve of ipsapirone in CB₁ mutants was shifted to the right as compared with that for wild-type mice (Fig 3B). Thus, the EC₅₀ value of ipsapirone was higher in CB₁ knockout mice (EC₅₀: 58.04 nM; 95% CI: 50.66 – 66.50 nM) than in wild-type mice (EC₅₀: 37.36 nM; 95% CI: 33.39 – 41.79 nM), indicating a functional desensitization of the 5-HT_{1A} autoreceptor in the DRN of CB₁ knockout mice.

The electrophysiological data obtained from the CB₁ knockout mice were in the same line than the results found by the pharmacological blockade of the CB₁ receptor with a chronic treatment with rimonabant (3mg/kg/day, 14 days) (Fig 4A and 4B). Two-way ANOVA revealed a significant ipsapirone concentration-dependent inhibition ($F_{(6, 96)} = 85.250$, $p < 0.001$), a significant effect of rimonabant treatment ($F_{(1, 96)} = 12.610$, $p < 0.001$) and a significant interaction between ipsapirone and rimonabant ($F_{(6, 76)} = 2.960$, $p < 0.05$) on the firing of serotonergic neurons (Fig 4A). Bonferroni's post hoc t test indicated a significant difference between vehicle- and rimonabant-treated mice at the ipsapirone 60 nM concentration ($p < 0.001$). Indeed, the concentration–response curve of ipsapirone in rimonabant chronically treated animals was significantly shifted to the right as compared to vehicle treated mice (Fig 4B). Thus, the EC₅₀ value of ipsapirone was higher in rimonabant-treated (EC₅₀: 53.99 nM; 95% CI: 43.88– 66.45 nM) than in vehicle-treated mice (EC₅₀: 30.13 nM; 95% CI: 23.16 – 34.76 nM), confirming a

functional desensitization of the 5-HT_{1A} autoreceptor in the DRN in the absence of CB₁ receptor activity.

Altered 5-HT_{2C} receptor expression in CB₁ knockout mice

In situ hybridization experiments were carried out to study the distribution of the mRNA coding for 5-HT_{2C} receptor in the brain of CB₁ receptor knockout and wild-type mice (Fig 5). Brain sections from both genotypes were included in the same hybridization experiment, and regions to be compared from both groups were exposed to the same β -max film. After the appropriate exposure time, optical densities over the regions of interest were determined for both groups and the values statistically analyzed by one-way ANOVA. A significant decrease in the expression of 5-HT_{2C} receptor was observed in most of the brain areas examined, including the nucleus *accumbens* (NAcc) ($F_{(1, 9)} = 9.069$, $p < 0.05$), caudate putamen nucleus (CPu) ($F_{(1, 10)} = 6.408$, $p < 0.05$), piriform cortex (Pir) ($F_{(1, 10)} = 17.264$, $p < 0.01$), paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) ($F_{(1, 9)} = 7.078$, $p < 0.05$), retrosplenial granular cortex (RSG) ($F_{(1, 10)} = 12.371$, $p < 0.01$), choroid plexus (ChP) ($F_{(1, 10)} = 59.036$, $p < 0.001$), habenula (Hab) ($F_{(1, 9)} = 6.855$, $p < 0.05$) and DRN ($F_{(1, 10)} = 5.682$, $p < 0.05$). In contrast, a significant increase in the 5-HT_{2C} receptor expression was observed in the CA3 area of the ventral hippocampus ($F_{(1, 10)} = 9.959$, $p < 0.05$). No significant differences were observed in the PFC, lateral amygdala (Amy) or periaqueductal gray (PAG) brain areas.

Discussion

The present study demonstrates that endocannabinoid system through CB₁ receptor modulates the activity of the serotonergic system. In particular, mice lacking CB₁ receptor exhibited increased 5-HT extracellular levels in the PFC that could be related to alterations in different serotonergic components involved in 5-HT feedback, such as 5-HTT, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptors.

In vivo microdialysis experiments demonstrated that CB₁ knockout mice display a slight elevation in the basal extracellular 5-HT levels in the PFC. Our observation is in agreement with the moderately increased 5-HT efflux reported in the rat cortex after the administration of the CB₁ antagonist rimonabant (Tzavara et al, 2003). However, the peripheral administration of fluoxetine resulted on lower increase of 5-HT extracellular levels in the PFC of the CB₁ knockout mice compared to wild-type animals, demonstrating that the blockade of CB₁ receptor activity deregulates serotonergic function. In order to raise this issue, we analysed some of the most important mechanisms that control serotonergic feedback in the absence of CB₁ receptor activity.

5-HTT mediates the 5-HT reuptake from the synaptic terminal and determines the size and duration of the serotonergic responses (Lesch and Mössner, 2006). Radioligand binding approaches revealed that CB₁ knockout mice exhibited a significantly lower 5-HTT binding site density in the frontal cortex and the hippocampus than wild-type mice. This finding could explain in part the decreased response to the fluoxetine treatment observed in mutants in the *in vivo* microdialysis experiments, given that 5-HTT is the target for the 5-HT reuptake-inhibiting antidepressant compounds such as fluoxetine. In addition, our observation also supports the increased basal 5-HT

extracellular levels in the PFC as seems to indicate a reduction in the 5-HT clearance of the synaptic cleft in the absence of CB₁ receptor activity.

The activity of the somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor, which negatively controls the firing rate of serotonergic neurons located in the DRN (Barnes and Sharp, 1999), was evaluated by using electrophysiological techniques. Extracellular recordings were performed in brain slices containing the DRN in the presence of concentration-increasing 5-HT_{1A} agonist ipsapirone. Ipsapirone concentration required for obtaining a reduction in the serotonergic firing was significantly higher in the CB₁ knockout mice than in wild-type mice, revealing a functional desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors in those mutants. Similar results were obtained in wild-type animals receiving a chronic treatment of the CB₁ receptor antagonist rimonabant. The functional desensitization of the 5-HT_{1A} autoreceptor demonstrated in this study through a genetic and a pharmacological blockade of CB₁ receptor is supported by the reduced hypothermia induced by the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT in CB₁ knockout mice previously reported (Mato et al, 2007). This finding could be linked to the increased basal 5-HT extracellular levels observed in the PFC of mutant animals since 5-HT_{1A} receptors were less efficient in inhibiting 5-HT neurons activity.

Although 5-HTT and 5-HT autoreceptors exert a clear-cut role within the regulation of 5-HT system, emerging findings indicate additional complexity of 5-HT feedback control involving post-synaptic 5-HT receptors (Sharp et al, 2007). Among all the post-synaptic receptors, we focused on 5-HT_{2C} receptor because of its participation on the regulation of emotional state beyond the involvement in 5-HT feedback regulation. This receptor plays an essential role in the 5-HT-induced HPA axis activation (Heisler et al, 2007) and also mediates the inhibition of dopaminergic system, a key component for hedonia and motivation (Dremencov et al, 2006). Then, we assessed the expression of

5-HT_{2C} receptors mRNA in different brain areas related to motivation, HPA axis and 5-HT feedback regulation by *in situ* hybridisation. CB₁ knockout mice exhibited a reduction in the expression of the 5-HT_{2C} receptor in the DRN, the NAcc and the PVN, among other brain areas. Interestingly, 5-HT_{2C} receptor was overexpressed in the CA3 area of the ventral hippocampus of CB₁ knockout mice, suggesting a differential role of this receptor in this discrete brain area, which would deserve additional attention. The decreased expression of 5-HT_{2C} receptor in the DRN of CB₁ mutant mice could lead to a reduction in the inhibitory effect exerted by 5-HT_{2C} receptor on 5-HT neurons through GABAergic mechanism (Boothman et al, 2006). This assumption could support the increased 5-HT extracellular levels in the brain areas receiving projections from the DRN in CB₁ knockout mice revealed by the present results. In the same way, the decreased levels of 5-HT_{2C} mRNA in mutant mice within the NAcc and the PVN could indicate a diminished capacity of this receptor to inhibit dopamine activity (Dremencov et al, 2006) and to stimulate corticotrophin-releasing factor release (Heisler et al, 2007), respectively.

In summary, the present results indicate that the lack of CB₁ receptor activity alters 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptors as well as the 5-HTT density, leading to increased 5-HT extracellular levels as we summarize in Fig 6. Classically, mood disorders have been associated to reduced 5-HT activity basing on the mechanism of action of antidepressant compounds (Charney, 1998; Artigas et al, 2002). In contrast to what we could expect considering this classical hypothesis, the genetic and pharmacological blockade of the CB₁ receptor induces a depressive-like phenotype (Hill and Gorzalka, 2005; Mangieri and Piomelli, 2007; Aso et al, 2008). CB₁ knockout mice exhibited several traits comparable to depressive symptoms, such as an anhedonic state (Sanchís-Segura et al, 2004; Maldonado et al, 2006), increased anxiety (Martín et al, 2002), neurovegetative

alterations (Cota et al, 2003) and impaired stress-coping behavior (Aso et al, 2008; Steiner et al, 2008). From our point of view, this apparent controversy demonstrates that the chronic absence of CB₁ receptor induces alterations in two different physiological mechanisms able to control emotional state. On one hand, CB₁ blockade increases 5-HT activity by altering different components of 5-HT feedback as reported in the present study. These alterations on 5-HT neurotransmission are similar to those described for chronic antidepressant treatments (Le Poul et al, 2000; Lanfumey et al, 2000; Gould et al, 2006). On the other hand, the absence of CB₁ receptor induces an increase in glucocorticoids release in response to stress (Cota, 2008). In this sense, we have previously demonstrated that the enhanced glucocorticoids levels in CB₁ knockout mice could produce hippocampal BDNF impairment, which plays a crucial role on the increased despair behavior exhibited by mutant animals (Aso et al, 2008). Our observations were in agreement with the new data that point out the deregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the deficiency of neurotrophic mechanisms as central substrates for the aetiology and pathophysiology of depression (Berton and Nestler, 2006). The structural modifications resulting on the alteration of neural plasticity in the hippocampus could impair the functionality of this brain area, decreasing in turn the inhibition on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. This situation could lead to a positive feedback on glucocorticoid release and facilitate emotional disturbances, including depression. As a result, in mutant mice the deregulation of glucocorticoid release and the deficiency of neurotrophic mechanisms could prevail upon the alterations on 5-HT neurotransmission after a chronic absence of CB₁ receptor activity. However, it could be reasonable to assume that the described increase in 5-HT levels could act at least in part as a substrate for counteracting the stress-induced emotional impairments in mice lacking CB₁ receptor, in the same manner

that has been described for antidepressant (D'Sa and Duman, 2002). Nevertheless, it has been reported an altered post-synaptic serotonergic signalling that could lead to a reduction in the efficacy of 5-HT in mutant mice (Mato et al, 2007). In summary, we can conclude that the lack of CB₁ receptor induces an increase in 5-HT extracellular levels by modulating different components of the serotonergic feedback although these alterations are not appropriate for ameliorate the depressive-like phenotype exhibited by CB₁ knockout mice.

Acknowledgements:

We thank Dulce Real, Marta Linares and Rocío Martín for their excellent technical support, Arnau Busquets for his help on the *in situ* hybridization experiments and Dr Patricia Robledo for kind advices about *in vivo* microdialysis procedure. This study has been supported by grants from the UE Sixth Framework Programme (NEWMOOD, LSHM-CT-2004-503474 to RM and LL), Spanish Ministry of Education & Science (SAF 2007/60249 to OV, BES-2005-8265 fellowship to EA) and Spanish Ministry of Health (PNSD Conv-2006 to OV).

References

- Artigas F., Nutt D.J., Shelton R. (2002) Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol Bull* **36**:123-132.
- Aso E., Ozaita A., Valdizán E.M., Ledent C., Pazos A., Maldonado R., Valverde O. (2008) BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB₁ knockout mice. *J Neurochem* **105**:565-572.
- Bambico F.R., Katz N., Debonnel G., Gobbi G. (2007) Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* **27**:11700-11711.
- Barnes N.M., Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**:1083-1152.
- Berton O., Nestler E.J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**:137-151.
- Best A.R., Regehr W.G. (2008) Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci* **28**:6508-6515.
- Boothman L.J., Allers K.A., Rasmussen K., Sharp T. (2003) Evidence that central 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B/C} receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat. *Br J Pharmacol* **139**:998-1004.
- Boothman L., Raley J., Denk F., Hirani E., Sharp T. (2006) In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol* **149**:861-869.
- Charney D.S. (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry* **59**:11-14.
- Cota D., Marsicano G., Tschöp M., Grübler Y., Flachskamm C., Schubert M., Auer D., Yassouridis A., Thöne-Reineke C., Ortman S., Tomassoni F., Cervino C., Nisoli E.,

- Linthorst A.C., Pasquali R., Lutz B., Stalla G.K., Pagotto U. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* **112**:423-431.
- Cota D. (2008) The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* **20**, Suppl 1:35-38.
- D'Sa C., Duman R.S. (2002) Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord*, **4**:183-194.
- Dremencov E., Weizmann Y., Kinor N., Gispan-Herman I., Yadid G. (2006) Modulation of dopamine transmission by 5-HT_{2C} and 5-HT₃ receptors: a role in the antidepressant response. *Curr Drug Targets* **7**:165-175.
- Gibaldi M., Perrier D. (1975) The trapezoid rule. In: Pharmacokinetics (Gibaldi M, Perrier D, eds), pp 293–296. New York: Marcel Dekker.
- Gould G.G., Altamirano A.V., Javors M.A., Frazer A. (2006) A comparison of the chronic treatment effects of venlafaxine and other antidepressants on serotonin and norepinephrine transporters. *Biol Psychiatry* **59**:408-414.
- Hajós M., Hajós-Korcsok E., Sharp T. (1999) Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* **126**:1741-1750.
- Heisler L.K., Pronchuk N., Nonogaki K., Zhou L., Raber J., Tung L., Yeo G.S., O'Rahilly S., Colmers W.F., Elmquist J.K., Tecott L.H. (2007) Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci* **27**:6956-6964.
- Hill M.N., Gorzalka B.B. (2005) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* **16**, 333-352.

Lanfumey L., Pardon M.C., Laaris N., Joubert C., Hanoun N., Hamon M., Cohen-Salmon C. (1999) 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport* **10**:3369-3374.

Lanfumey L., Mannoury la Cour C., Froger N., Hamon M. (2000) 5-HT-HPA interactions in two models of transgenic mice relevant to major depression. *Neurochem Res* **25**:1199-1206.

Le Poul E., Boni C., Hanoun N., Laporte A.M., Laaris N., Chauveau J., Hamon M., Lanfumey L. (2000) Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* **39**:110-122.

Ledent C., Valverde O., Cossu G., Petitet F., Aubert J.F., Beslot F., Bohme G.A., Imperato A., Pedrazzini T., Roques B.P., Vassart G., Fratta W., Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science* **283**:401-404.

Lesch K.P., Mössner R. (2006) Inactivation of 5-HT transport in mice: modeling altered 5-HT homeostasis implicated in emotional dysfunction, affective disorders, and somatic syndromes. *Handb Exp Pharmacol* **175**:417-456.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.

Maldonado R., Valverde O., Berrendero F. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* **29**, 225-232.

Mangieri R.A., Piomelli D. (2007) Enhancement of endocannabinoid signaling and the pharmacotherapy of depression. *Pharmacol Res* **56**:360-366.

Marsicano G., Wotjak C.T., Azad S.C., Bisogno T., Rammes G., Cascio M.G., Hermann H., Tang J., Hofmann C., Zieglgänsberger W., Di Marzo V., Lutz B. (2002)

The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**:530-534

Martín M., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R., Valverde O. (2002) Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in emotional behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **159**, 379-387.

Mato S., Aso E., Castro E., Martín M., Valverde O., Maldonado R., Pazos A. (2007) CB₁ knockout mice display impaired functionality of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors. *J Neurochem* **103**:2111-2120.

Moreira F.A., Lutz B. (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* **13**:196-212.

Nichols D.E., Nichols C.D. (2008) Serotonin receptors. *Chem Rev* **108**:1614-1641

Nutt D.J. (2002) The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol* **17**:S1-12.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press, San Diego.

Sanchís-Segura C., Cline B.H., Marsicano G., Lutz B., Spanagel R. (2004) Reduced sensitivity to reward in CB₁ knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* **176**:223-232.

Serrats J., Mengod G., Cortés R. (2005) Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat* **29**:83-91.

Sharp T., Boothman L., Raley J., Quéree P. (2007) Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci* **28**:629-636.

Steiner M.A., Wanisch K., Monory K., Marsicano G., Borroni E., Bächli H., Holsboer F., Lutz B., Wotjak C.T. (2008) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J* **8**, 196-208.

- Szabo B., Schlicker E. (2005) Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol* **168**:327-65.
- Trigo J.M., Renoir T., Lanfumey L., Hamon M., Lesch K.P., Robledo P., Maldonado R. (2007) 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. *Biol Psychiatry* **62**:669-79.
- Tzavara E.T., Davis R.J., Perry K.W., Li X., Salhoff C., Bymaster F.P., Witkin J.M., Nomikos G.G. (2003) The CB₁ receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol* **138**:544-553.
- Valverde O. (2005) Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behavior. *Curr Pharm Des* **11**, 3421-3429.
- Vandermaelen C.P., Aghajanian G.K. (1983) Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* **289**:109-119.

Figure 1. *In vivo* microdialysis experiments in the PFC of CB₁ knockout mice. (A) Increased basal 5-HT extracellular levels in the PFC of CB₁ knockout (filled bar) compared to wild-type (open bar) mice (n = 26). (B) Decreased percentage of increase of the 5-HT extracellular levels in the CB₁ knockout mice (filled squares) respect to the wild-type littermates (open squares) after the fluoxetine administration (n = 8-10). (C) AUC values for the percentage of increase of the 5-HT concentration in dialysates after fluoxetine or saline administration in CB₁ knockout (filled bars) and wild-type (open bars) mice respect to basal values. Data are expressed as mean ± SEM. ★ p < 0.05, ★★ p < 0.01 comparison between genotypes; ★★★ p < 0.001, when compared with the saline group of the same genotype (one-way ANOVA). Significant comparisons between the fluoxetine-treated (squares) and the saline-treated (triangles) groups are not included in order to clarify the figure.

Figure 2. 5-HTT quantification by [³H]Citalopram binding onto brain membranes revealed decreased 5-HTT levels in the frontal cortex and hippocampus of CB₁ knockout (filled bar) compared to wild-type (open bar) mice at basal conditions. Data are expressed as mean ± SEM (n = 10-11). ★ p < 0.05, ★★★ p < 0.001 compared to wild-type mice (one-way ANOVA).

Figure 3. Effect of ipsapirone on the firing of DRN 5-HT neurons in CB₁ mutants compared with wild-type mice. (A) Integrated firing rate histograms (in spikes per 10 sec) show the effect of increasing doses of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone on the electrical activity of a DRN 5-HT neuron in a control animal (upper) compared with a CB₁ mutant (down). (B) Dose–response curves of ipsapirone-induced inhibition of the firing of DRN 5-HT neurons in brainstem slices from CB₁ knockout compared with

wild-type mice. Ipsapirone-induced inhibition is expressed as percentage of the baseline firing rate. Each point is the mean \pm SEM of data obtained from 15–21 individual cells. The dotted lines illustrate the EC₅₀ values of ipsapirone (abscissa) in CB₁ mutants and wild-type mice. $\star p < 0.05$ as compared with the respective inhibition in wild-type mice.

Figure 4. Effect of ipsapirone on the firing of DRN 5-HT neurons in CD1 mice chronically treated with rimonabant (3 mg/kg/day, 14 days) or vehicle. (A) Integrated firing rate histograms (in spikes per 10 sec) show the effect of increasing doses of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone on the electrical activity of a DRN 5-HT neuron in a vehicle treated (upper) compared with a rimonabant chronically treated animal (down). (B) Dose–response curves of ipsapirone-induced inhibition of the firing of DRN 5-HT neurons in brainstem slices from rimonabant chronically treated animals compared with vehicle treated mice. Ipsapirone-induced inhibition is expressed as percentage of the baseline firing rate. Each point is the mean \pm SEM of data obtained from 13–16 individual cells. The dotted lines illustrate the EC₅₀ values of ipsapirone (abscissa) in rimonabant chronically treated animals and vehicle treated mice. $\star\star\star p < 0.001$ as compared with the respective inhibition in wild-type mice.

Figure 5. *In situ* hybridisation of 5-HT_{2C} receptor in CB₁ knockout mice. (A) Representative images of Cresyl Violet staining showing brain areas examined (right) and visualization of mRNA encoding 5-HT_{2C} in different coronal levels of wild-type (middle) and CB₁ knockout mice (left). (B) Quantification of the optical density in each brain area examined. CB₁ knockout mice (filled bars) exhibited decreased 5-HT_{2C} receptor expression in almost all the brain areas studied, excepting the CA3 area of the ventral hippocampus in which a significant increase was observed. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 5-6). $\star p < 0.05$, $\star\star p < 0.01$, $\star\star\star p < 0.001$ compared to wild-type

mice (one-way ANOVA). *PFC*, prefrontal cortex; *NAcc*, nucleus accumbens; *CPu*, caudate-putamen nucleus; *Pir*, piriform cortex; *PVN*, paraventricular nucleus of the hypothalamus; *Amy*, lateral amygdala; *RSG*, retrosplenial granular cortex; *ChP*, choroid plexus; *Hab*, habenula; *CA3*, CA3 area of the ventral hippocampus; *PAG*, periaqueductal gray; *DR*, dorsal raphe nuclei.

Figure 6. Schematic representation of the mechanisms involved in serotonergic feedback that are altered in the absence of CB₁ receptor activity. A 5-HT projection from the DRN to the PFC is represented in wild-type mice (upper panel) and CB₁ knockout mice (lower panel). 5-HT (red circles) is released by 5-HT neurons (in red) located in the DRN, binds to 5-HT post-synaptic receptors (in dark blue) and is selectively reuptaken by 5-HTT (in light blue) located in 5-HT terminals. 5-HT_{1A} autoreceptors (in light green) situated in the soma of 5-HT neurons are able to inhibit the 5-HT firing. In the DRN, CB₁ cannabinoid receptors (in purple) and 5-HT_{2C} receptors (in orange) are supposed to be mainly located on GABAergic interneurons (in dark green). Activation of CB₁ receptors in the DRN produces inhibition of GABA release, thus removing the inhibitory effect of these GABAergic cells on 5-HT neurons. In contrast, activation of 5-HT_{2C} receptors induces GABA release, promoting the inhibitory effect of these GABAergic cells on 5-HT neurons. Thus, the balance between the activity of 5-HT_{2C} and CB₁ receptors could determine the net effect of the GABAergic modulation on 5-HT neurons. The absence of CB₁ receptor activity (lower panel) alters different serotonergic components leading to increased 5-HT extracellular levels by decreasing the activity of the receptors that directly or indirectly produce an inhibitory effect on 5-HT neurons and reducing the 5-HT clearance of the synaptic cleft. Hence, CB₁ knockout mice exhibited a significant desensitization of 5-HT_{1A}

autoreceptor, decreased 5-HTT levels in the PFC and diminished expression of 5-HT_{2C} receptor in the DRN.

Figure 1

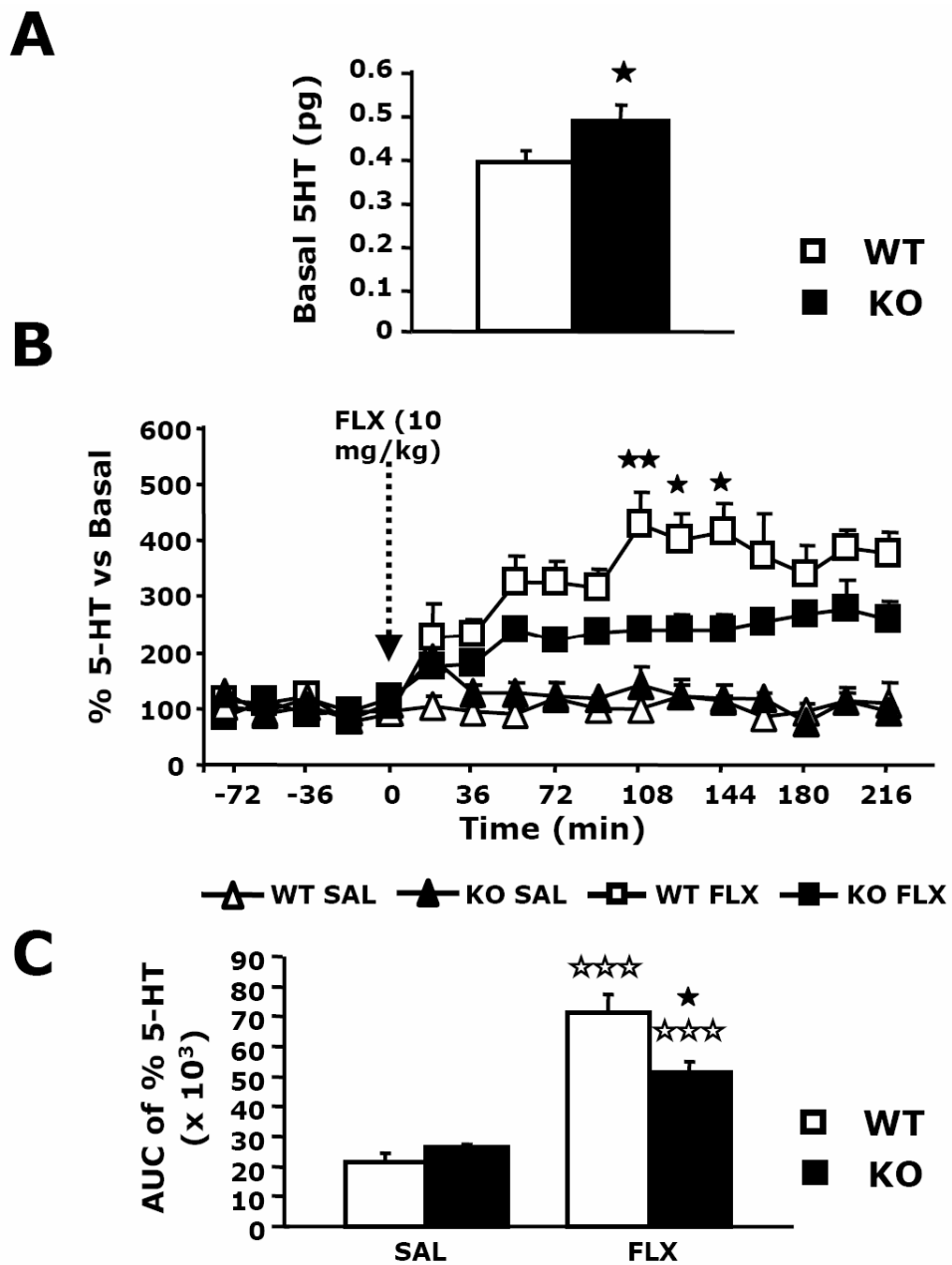


Figure 2:

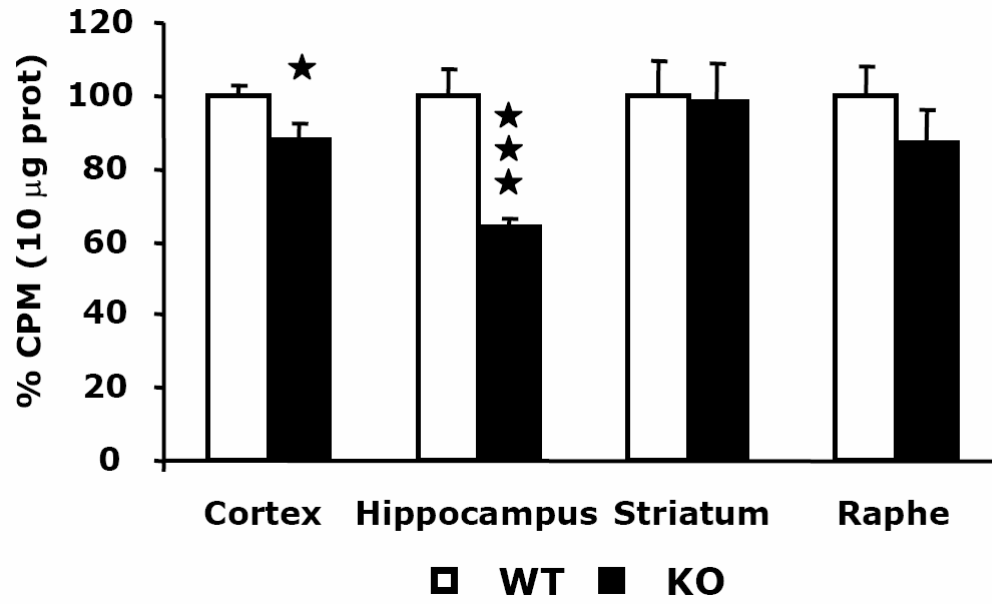


Figure 3:

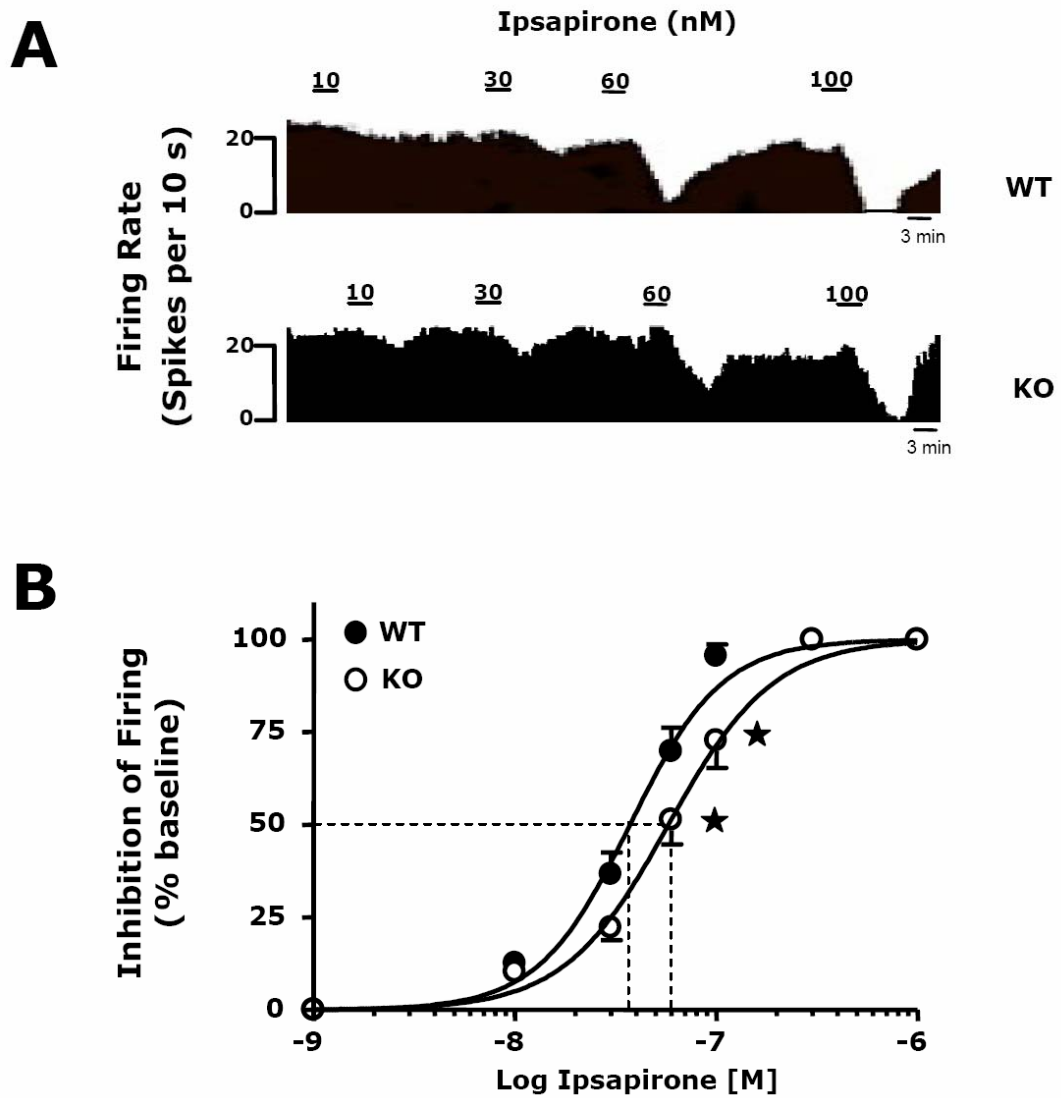


Figure 4:

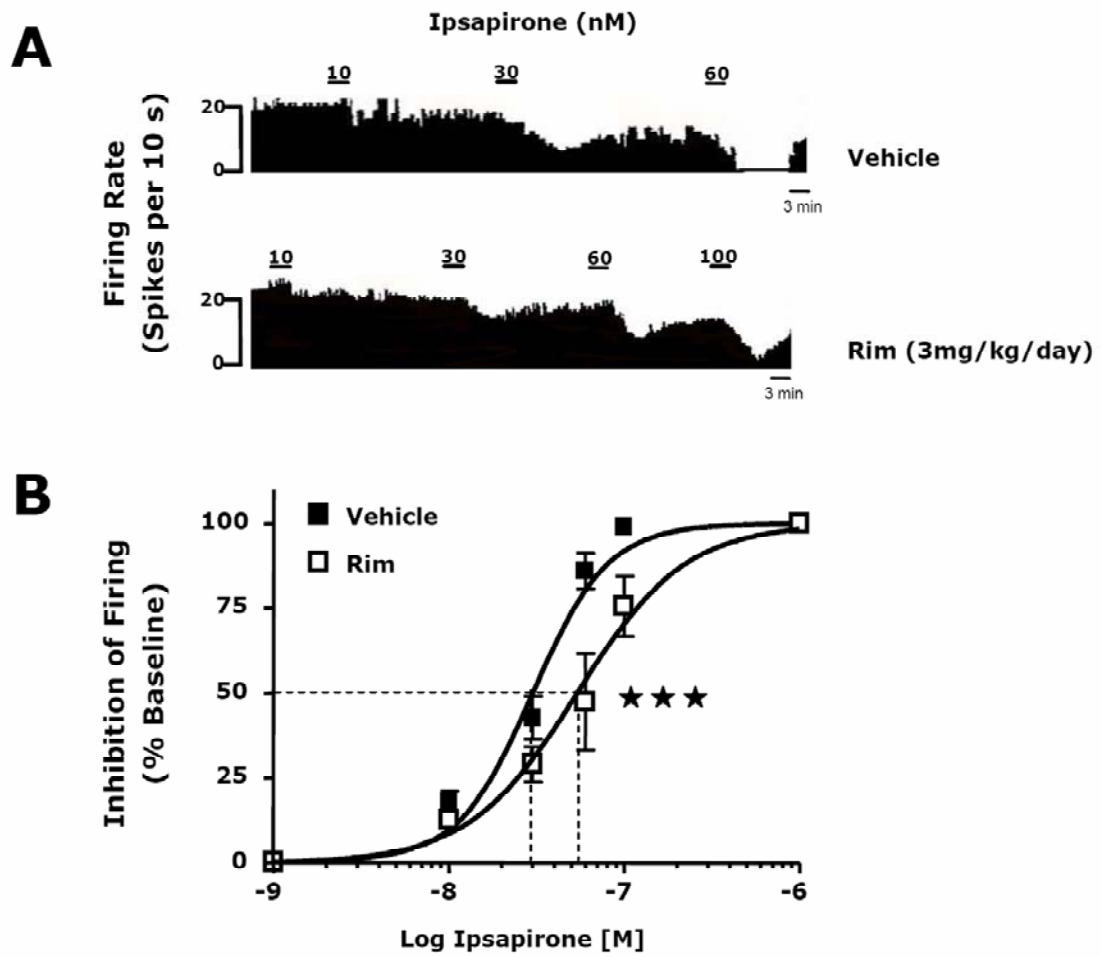


Figure 5:

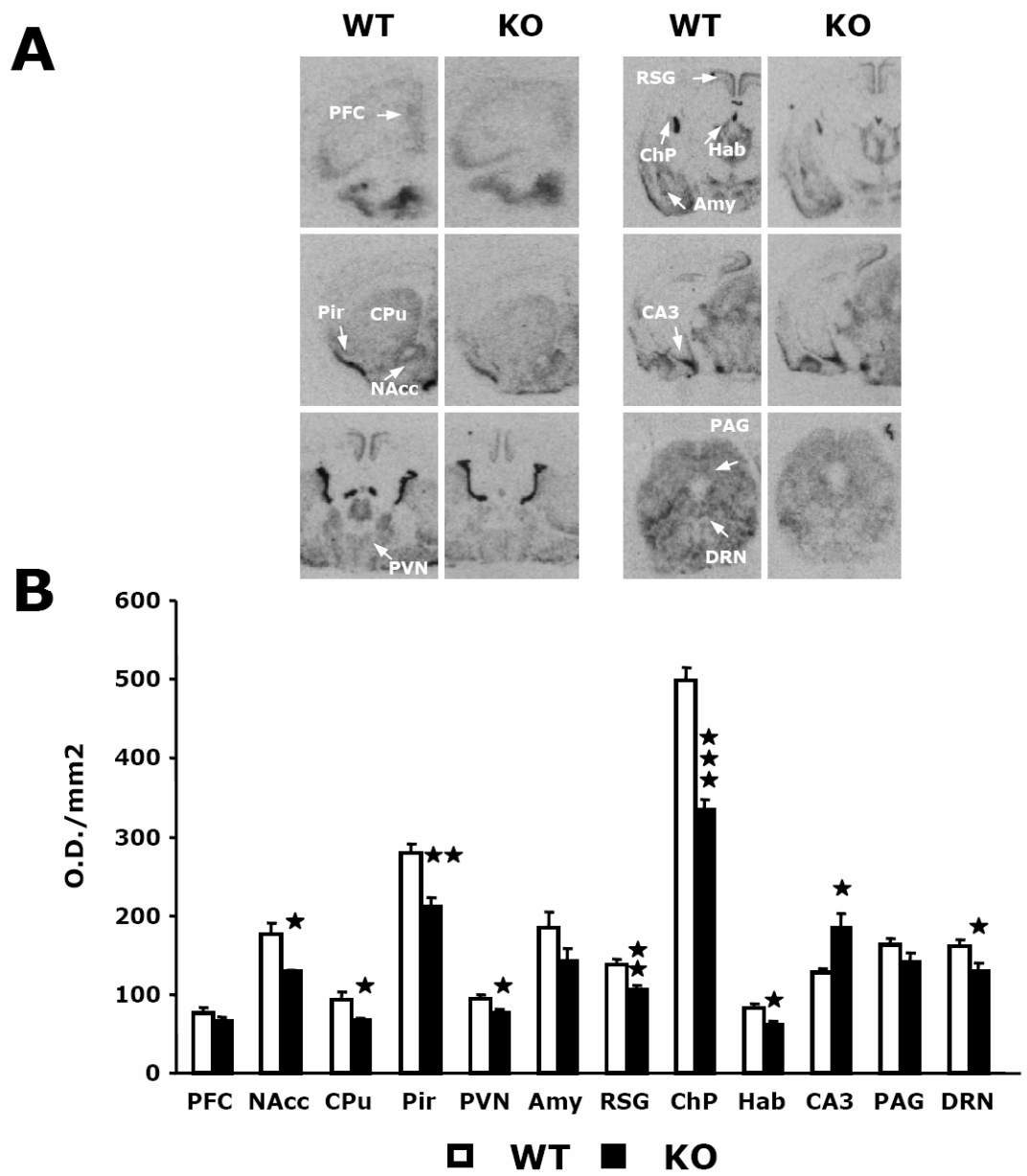
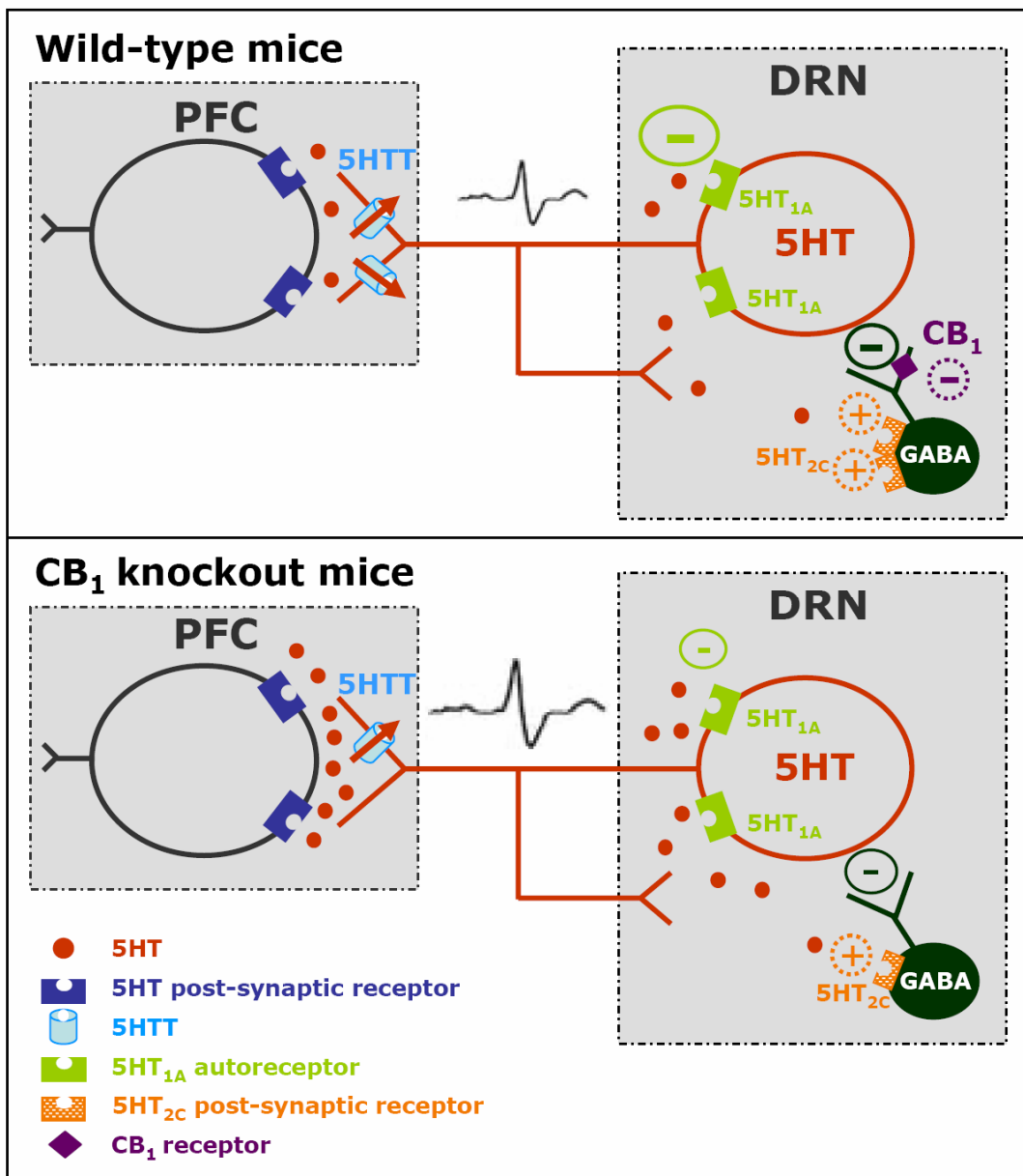


Figure 6:



ARTÍCULO 4

Delta9-tetrahydrocannabinol decreases somatic and motivational manifestations of nicotine withdrawal in mice

Balerio GN, Aso E, Berrendero F, Murtra P, Maldonado R

Eur J Neurosci (2004) 20:2737-48

OBJETIVOS:

Analizar la participación del sistema endocannabinoide en las manifestaciones físicas y emocionales del síndrome de abstinencia de la nicotina en el ratón.

RESULTADOS:

- Las manifestaciones físicas de la abstinencia de nicotina fueron atenuadas por la administración del agonista cannabinoide Δ^9 -THC.
- El tratamiento crónico con nicotina no indujo cambios adaptativos en la densidad o en la capacidad de acoplamiento a las proteínas G del receptor CB₁.
- Las manifestaciones emocionales aversivas de la abstinencia de nicotina fueron atenuadas por la administración del agonista cannabinoide Δ^9 -THC.

CONCLUSIÓN:

La estimulación del sistema endocannabinoide es capaz de atenuar las manifestaciones somáticas y emocionales de la abstinencia de nicotina.

Balerio GN, Aso E, Berrendero F, Murtra P, Maldonado R.
[Delta9-tetrahydrocannabinol decreases somatic and motivational
manifestations of nicotine withdrawal in mice.](#)
Eur J Neurosci. 2004 Nov;20(10):2737-48.

ARTÍCULO 5

Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice.

Balerio GN, Aso E, Maldonado R

Psychopharmacology (Berl) (2006) 14: 1-10

OBJETIVOS:

Analizar la participación del sistema endocannabinoide en los efectos inducidos por la nicotina sobre la ansiedad en el ratón.

RESULTADOS:

- El bloqueo farmacológico del receptor CB₁ anuló los efectos ansiolíticos inducidos por una dosis baja de nicotina y potenció los efectos ansiogénicos producidos por la administración de una dosis alta de nicotina.
- La administración del agonista cannabinoide Δ^9 -THC atenuó los efectos ansiogénicos inducidos por una dosis alta de nicotina pero no modificó la capacidad ansiolítica de una dosis baja de nicotina.
- La administración de dosis subefectivas de nicotina y Δ^9 -THC produjo un efecto ansiolítico en el ratón.

CONCLUSIÓN:

La actividad del receptor CB₁ modula los efectos inducidos por la nicotina sobre la ansiedad, aliviando los efectos ansiogénicos de dosis elevadas y facilitando los efectos ansiolíticos de dosis bajas de nicotina.

Balerio GN, Aso E, Maldonado R.

*Role of the cannabinoid system in the effects induced by
nicotine on anxiety-like behaviour in mice.*

Psychopharmacology (Berl). 2006 Mar;184(3-4):504-13. Epub 2006
Jan 14.

DISCUSIÓN

Los trastornos emocionales de tipo depresivo y la ansiedad son las formas más prevalentes de enfermedad mental y suponen un serio problema de salud en la sociedad occidental. Se trata de patologías complejas y heterogéneas en las que participan sustratos neuroquímicos y neuroanatómicos muy diversos que dificultan la completa comprensión de su etiología y de su fisiopatología. Recientemente, se ha postulado que el sistema endocannabinoide pueda ser un importante sustrato en el desarrollo de estos trastornos dada su participación en el control de las emociones. En este sentido, la presente Tesis Doctoral trata de profundizar en el conocimiento de la función desarrollada por el sistema endocannabinoide en las manifestaciones emocionales de dichos trastornos, utilizando para ello modelos animales.

Participación del sistema endocannabinoide en los trastornos emocionales de tipo depresivo

La investigación realizada en modelos de experimentación animal ha permitido proponer la participación del sistema endocannabinoide en el desarrollo de los trastornos afectivos de tipo depresivo. Entre las evidencias acumuladas destaca el hecho de que los animales carentes del receptor cannabinoide CB₁ manifiestan una menor capacidad para hacer frente a las situaciones que generan estrés (Steiner y cols, 2008a), así como una mayor vulnerabilidad para desarrollar anhedonia como consecuencia de la exposición crónica a situaciones de estrés leve e impredecible (Martín y cols, 2002). Asimismo, los resultados de los ensayos clínicos realizados para evaluar la eficacia del antagonista del receptor CB₁ rimonabant en la obesidad y el síndrome metabólico revelan que el bloqueo prolongado del receptor CB₁ comporta un incremento del riesgo de desarrollar trastornos emocionales puesto que la aparición de síntomas depresivos fue la primera causa de abandono en estos ensayos (Pi-Sunyer y cols, 2006).

En consonancia con estas evidencias clínicas y preclínicas, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral (**Artículo 1**) demuestran que los ratones carentes del receptor CB₁ manifiestan un **comportamiento de tipo depresivo**, caracterizado por un mayor tiempo de inmovilidad en el test de la suspensión de la cola respecto a los animales control. Esta conducta en el animal es considerada como un comportamiento de desespero frente a una situación de estrés incontrolable (Willner y Mitchell, 2002; Nestler y cols, 2002b). Además, nuestros resultados muestran que dicha respuesta conductual ante el estrés se correlaciona con unos **niveles de corticosterona** en sangre **más elevados** en los ratones mutantes que en los animales control, tal como había sido descrito en estudios previos (Barna y cols, 2004; Urigüen y cols, 2004; Cota y cols, 2007). Esta

observación corrobora las evidencias que demuestran que el receptor CB₁ ejerce un control inhibitorio sobre el eje HPA (Di y cols, 2003; Cota y cols, 2007), de modo que una deficiencia de este receptor origina una menor inhibición de la liberación de corticosterona. La modulación deficiente de los niveles de glucocorticoides observada en los ratones mutantes para el receptor CB₁ puede ser una razón que sustente el fenotipo de tipo depresivo manifestado por estos animales. En efecto, el trastorno depresivo se asocia a una desregulación neuroendocrina que produce una elevación de los niveles de glucocorticoides en una alta proporción de pacientes deprimidos (Holsboer, 2001). A dicha elevación de glucocorticoides se le atribuye la participación en algunos síntomas característicos de la depresión, tales como las deficiencias cognitivas asociadas a cambios estructurales en el hipocampo y en la corteza frontal o el incremento de los niveles de ansiedad inducido por la hiperactividad de la amígdala (McEwen, 2005). Así, modificaciones estructurales de estas áreas cerebrales inducidas por los elevados niveles de glucocorticoides circulantes en los animales carentes del receptor CB₁ podrían comprometer la funcionalidad de estas estructuras y dar lugar a la aparición de síntomas comparables a los descritos en los pacientes deprimidos. La principal razón por la que los niveles elevados de glucocorticoides pueden alterar estructural y funcionalmente áreas cerebrales es por su propiedad moduladora sobre la plasticidad neuronal. La capacidad de supervivencia y de remodelación de las conexiones neuronales resulta fundamental para la adaptación a las diferentes situaciones a las que se enfrenta el individuo. Esta capacidad se ve comprometida durante el desarrollo de una depresión debido a la disminución de los niveles de factores tróficos inducida por los niveles elevados de glucocorticoides (Pittenger y Duman, 2008).

Partiendo de estas observaciones, nuestro **primer objetivo** ha sido investigar la posible relación entre la respuesta alterada al estrés y los niveles de factores neurotróficos que modulan la plasticidad neuronal en los animales mutantes para el receptor CB₁. Así, hemos evaluado los niveles de los factores neurotróficos BDNF, NT-3 y NGF en diversas áreas cerebrales relacionadas con el control emocional (hipocampo, corteza frontal y amígdala). Nuestros resultados nos han permitido constatar que los animales carentes del receptor CB₁ presentan un **déficit de BDNF** en el **hipocampo**, tanto a nivel basal como en respuesta al estrés. Esta deficiencia de BDNF ha sido corroborada posteriormente por Steiner y cols (2008a), los cuales han observado en el hipocampo de dichos mutantes una disminución de la expresión génica de este factor neurotrófico. Con el fin de profundizar en la naturaleza de esta deficiencia de BDNF en el hipocampo de los animales mutantes, hemos analizado la actividad del factor de transcripción CREB,

que modula la expresión de este factor neurotrófico, y los niveles de su receptor específico TrkB sin hallar modificaciones en ninguno de estos dos elementos. De esta manera, podemos descartar que la deficiencia de BDNF en el hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁ esté relacionada con alteraciones a nivel del receptor o del principal factor de transcripción del BDNF.

En contraste con los resultados obtenidos en el hipocampo, otras estructuras cerebrales como la corteza frontal y la amígdala presentan en los ratones mutantes niveles de BDNF similares a los animales normales. Estos datos sugieren que la alteración de BDNF observada en el hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁ es posiblemente consecuencia del efecto de la exposición a niveles elevados de glucocorticoides. En este sentido, ha sido descrita una mayor sensibilidad del hipocampo a los efectos nocivos del estrés, que se relaciona con la elevada densidad de receptores para glucocorticoides existente en dicha estructura (Sapolsky, 2003). De hecho, se ha demostrado que la exposición crónica o severa al estrés puede inducir una deficiencia en el aporte neurotrófico preferentemente en el hipocampo (Smith y cols, 1995; Jacobsen y Mørk, 2006). Como se ha apuntado con anterioridad, a consecuencia de los cambios en la plasticidad sináptica del hipocampo inducidos por el estrés crónico, la funcionalidad de esta estructura puede verse afectada. Entre las alteraciones que se pueden producir, destaca una reducción del control inhibitorio que el hipocampo ejerce sobre el eje HPA, lo cual contribuiría a una retroalimentación positiva en la liberación de glucocorticoides que podría promover la aparición de alguno de los procesos patológicos descritos en la depresión, como son la reducción del volumen hipocámpal y las alteraciones de las funciones cognitivas (Bremner y cols, 2000; Duman y Monteggia, 2006).

Con el objetivo de profundizar en la relevancia de la deficiencia de BDNF en el fenotipo de tipo depresivo exhibido por los ratones carentes del receptor CB₁, hemos administrado BDNF localmente en el hipocampo de estos animales y hemos observado la reacción comportamental en el test de suspensión de la cola. En ambos genotipos, el BDNF induce una reducción del tiempo de inmovilidad de los animales respecto a los controles tratados con vehículo, demostrando el efecto antidepresivo de este factor neurotrófico. En nuestra opinión, el resultado más destacado ha sido la **reversión** completa de la **conducta de tipo depresiva** de los animales mutantes tratados con una **microinyección** local de **BDNF** en el hipocampo. De esta manera, hemos demostrado que el BDNF desempeña un papel fundamental en el comportamiento de tipo depresivo producido por la ausencia del receptor CB₁ en el ratón.

Por otra parte, hemos analizado en el hipocampo de los animales deficientes en el receptor CB₁ los niveles de NT-3 y NGF, otros dos factores tróficos implicados en la plasticidad y supervivencia de las neuronas adultas (Huang y Reichardt, 2001). A diferencia del BDNF, no hemos observado alteraciones en los niveles de NT-3 y NGF en los animales mutantes en condiciones basales. Estos resultados sugieren una mayor sensibilidad del BDNF a los efectos negativos del estrés y corroboran las evidencias previas que señalan a este factor neurotrófico como un regulador clave en los mecanismos de neuroprotección dependientes del receptor CB₁ (Khaspekov y cols, 2004). De esta manera, la alteración neurotrófica revelada en nuestros resultados podría estar relacionada con las evidencias acumuladas sobre deficiencias en la plasticidad descritas previamente en estos mutantes. Entre dichas evidencias, caben destacar la menor capacidad de protección frente a la excitotoxicidad (Marsicano y cols, 2003), la disminución de la neurogénesis en el giro dentado y en la zona subventricular (Jin y cols, 2004) o la mayor pérdida neuronal asociada al envejecimiento en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo que va acompañada de un deterioro acelerado de las funciones cognitivas (Bilkei-Gorzo y cols, 2005).

A pesar de la relevancia de estos resultados, queda por elucidar cuáles son los mecanismos moleculares que relacionan la actividad del receptor CB₁ con la expresión del BDNF. Desde nuestro punto de vista, existen dos posibles **hipótesis**, que no son excluyentes entre sí, sobre la conexión entre el receptor CB₁ y la expresión del BDNF. La **primera** de ellas ha sido citada anteriormente y propondría que la deficiencia de BDNF es consecuencia de los niveles elevados y sostenidos de glucocorticoides causados por la ausencia del control inhibitorio del receptor CB₁ sobre el eje HPA en los animales mutantes. Esta hipótesis está respaldada por estudios previos que demuestran la disminución de la expresión de BDNF inducida por los glucocorticoides (Smith y cols, 1995; Jacobsen y Mørk, 2006). Además, otro hecho que sustenta esta hipótesis es que la deficiencia de BDNF se ha observado específicamente en el hipocampo, estructura con una elevada vulnerabilidad a los efectos del estrés. La **segunda hipótesis** en cambio, plantearía la posibilidad de que la disminución del BDNF inducida por la exposición al estrés prolongado o severo en los animales mutantes se deba a otros mecanismos, más allá de la liberación de glucocorticoides, en los que el receptor CB₁ desempeña igualmente un papel destacado. Uno de estos mecanismos sería la regulación de la actividad serotoninérgica inducida por el estrés. Así, se ha descrito que el estrés produce un aumento de la transmisión serotoninérgica que, mediante la activación de los receptor 5-HT_{2A} ubicados en las neuronas GABAérgicas, origina una disminución de la expresión del BDNF en el hipocampo (Vaidya y cols, 1997;

1999). Por el contrario, el tratamiento crónico con compuestos antidepresivos que incrementan la transmisión monoaminérgica induce la síntesis de BDNF (Conti y cols, 2002), aunque este efecto se produce supuestamente mediante la activación de otros receptores diferentes al 5-HT_{2A}. En definitiva, nuestra segunda hipótesis se basa en los resultados que se discutirán a continuación, que demuestran que la ausencia del receptor CB₁ produce una desregulación de la actividad serotoninérgica sin modificar la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} en el hipocampo (**Artículos 2 y 3**). De esta manera, el aumento de la transmisión serotoninérgica en los animales mutantes podría estar relacionado con la deficiencia de BDNF observada en el hipocampo de dichos animales.

Teniendo en cuenta la relación existente entre el sistema serotoninérgico y los trastornos emocionales en general, el **siguiente objetivo** de la presente Tesis Doctoral ha sido investigar el papel desempeñado por el receptor CB₁ en la transmisión serotoninérgica analizando la funcionalidad de diferentes componentes de dicho sistema de neurotransmisión en ausencia de la actividad del receptor cannabinoide. En primer lugar, hemos evaluado la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} mediante una aproximación bioquímica y farmacológica, ya que estos receptores son componentes importantes de la señalización serotoninérgica y existen evidencias de su participación en los trastornos de tipo depresivo (Celada y cols, 2004). Los animales carentes del receptor CB₁ manifiestan una reducción de los efectos farmacológicos inducidos por agonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} en la temperatura corporal y en la aparición de estereotipias respectivamente, que no se correlaciona con cambios en la densidad de estos receptores en ninguna de las áreas cerebrales analizadas por autorradiografía (**Artículo 2**). Asimismo, se ha observado una disminución de la capacidad de acoplamiento a las proteínas G de los receptores 5-HT_{1A} en el área CA1 del hipocampo y de los 5-HT_{2A/2C} en la corteza fronto-parietal. En cambio, la administración de compuestos inhibidores de la recaptación de la 5-HT o de antidepresivos tricíclicos muestra una eficacia similar en ambos genotipos cuando se evalúa el comportamiento en los test de la natación forzada y de la suspensión de la cola. En conjunto, estos resultados evidencian una **deficiencia en la funcionalidad** de los receptores **5-HT_{1A}** y **5-HT_{2A/2C}** en ausencia de actividad del receptor CB₁. Estos resultados sugieren, por una parte, que pueda existir una alteración de la señalización serotoninérgica en los animales mutantes y, por otra, que algunos de los efectos mediados por los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} requieran la actividad del receptor CB₁, como ha sido propuesto por otros autores (Cheer y cols, 1999; Hill y cols, 2006b).

La interacción entre el sistema cannabinoide y el serotoninérgico ha sido propuesta por varios autores, si bien la naturaleza de esta relación continúa siendo controvertida. Mientras que algunos autores han observado un incremento de la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo del rafe dorsal debido a la activación del receptor CB₁ (Gobbi y cols, 2005), otros han demostrado una inhibición de la liberación de 5-HT en el hipocampo y en la corteza frontal tras la estimulación del dicho receptor (Nakazi y cols, 2000; Egashira y cols, 2002) e incluso una estimulación de la liberación de 5-HT tras el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ (Tzavara y cols, 2003; Darmani y cols, 2003). De acuerdo con estos últimos datos, nuestros resultados han demostrado que los **niveles extracelulares de 5-HT** en la corteza prefrontal de los animales carentes del receptor CB₁ medidos con la técnica de microdiálisis *in vivo* están **incrementados** en condiciones basales respecto a los ratones control (**Artículo 3**). En cambio, el **incremento de 5-HT en respuesta** a la estimulación con **fluoxetina** es **menor** en estos mutantes. Estos hallazgos sugieren que la ausencia de actividad del receptor CB₁ induce una desregulación de los mecanismos que controlan la actividad serotoninérgica. Por esta razón, hemos analizado en animales carentes del receptor CB₁ la funcionalidad de diferentes componentes que participan en la retroalimentación de la 5-HT, como los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C}, que inhiben directa o indirectamente la actividad de las neuronas serotoninérgicas, o el 5-HTT que recupera la 5-HT liberada en el espacio extracelular.

El autorreceptor 5-HT_{1A} se encuentra en el soma de las neuronas serotoninérgicas y controla negativamente la actividad eléctrica de las propias neuronas (Barnes y Sharp, 1999). La funcionalidad de este receptor presináptico puede evaluarse mediante el registro electrofisiológico de la actividad de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal en presencia de concentraciones crecientes de un agonista 5-HT_{1A} (Lanfume y cols, 1999). Nuestros resultados demuestran que los animales mutantes para el receptor CB₁ presentan una **desensibilización del receptor 5-HT_{1A}** que se manifiesta por el incremento de la concentración del agonista 5-HT_{1A} necesaria para inhibir la actividad de las neuronas serotoninérgicas. Además, hemos observado una desensibilización similar del receptor 5-HT_{1A} en animales que recibieron un tratamiento crónico con rimonabant, lo cual confirma la alteración de la función de este autorreceptor tras el bloqueo prolongado del receptor CB₁, que ya había sido propuesta en el anterior trabajo utilizando una aproximación farmacológica (**Artículo 2**). La menor capacidad del receptor 5-HT_{1A} para inhibir la actividad eléctrica de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal podría ser una de las causas que

explicasen los niveles aumentados de 5-HT extracelular observados en la corteza prefrontal en condiciones basales.

Otra razón que justificaría estos niveles elevados de 5-HT sería la **disminución de la densidad de 5-HTT** que observamos en la corteza frontal y en el hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁. En efecto, teniendo en cuenta que el 5-HTT es el responsable de la recaptación la 5-HT en la hendidura sináptica (Lesch y Mössner, 2006), una disminución de la densidad de este transportador induciría un aumento de la concentración de 5-HT en el espacio sináptico. Además, la disminución de los niveles de 5-HTT en la corteza prefrontal podría ser la causa del menor incremento de 5-HT extracelular observado en los animales deficientes en el receptor CB₁ en respuesta a la fluoxetina, antidepresivo cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de dicho transportador.

El último de los componentes serotoninérgicos implicados en la retroalimentación de la 5-HT que hemos evaluado es el receptor 5-HT_{2C}. Este receptor inhibe la actividad serotoninérgica mediante la activación de las neuronas GABAérgicas (Boothman y cols, 2006) en las que se encuentra principalmente expresado a nivel del núcleo del rafe dorsal (Serrats y cols, 2005). No obstante, de entre todos los receptores postsinápticos de 5-HT que participan indirectamente en la regulación de la transmisión serotoninérgica (Sharp y cols, 2007) nos centramos en el 5-HT_{2C} por su posible implicación en los trastornos emocionales más allá del control que ejerce sobre la actividad serotoninérgica. Así, el receptor 5-HT_{2C} participa en la activación del eje HPA (Heisler y cols, 2007) y en el control de la liberación de dopamina asociada a la vía mesocorticolímbica que regula la motivación, de manera que puede estar implicado en la anhedonia manifestada por los pacientes depresivos (Dremencov y cols, 2006). Mediante la técnica de hibridación *in situ*, hemos analizado la expresión de este receptor en diferentes áreas relacionadas con el control de las emociones en el cerebro del ratón. Los animales mutantes presentan una **disminución** generalizada de la **expresión del receptor 5-HT_{2C}** respecto a los animales control en la mayoría de las regiones analizadas. Resulta especialmente relevante la disminución de la expresión de este receptor observada en el núcleo del rafe dorsal en relación al papel desempeñado por este receptor en la inhibición de la actividad serotoninérgica (Boothman y cols, 2006). De esta manera, cabe suponer que la menor expresión del receptor 5-HT_{2C} en los animales mutantes resulta en una menor inhibición de las neuronas serotoninérgicas que contribuye al incremento en la liberación de 5-HT que muestran nuestros resultados de microdiálisis *in vivo* en la corteza prefrontal.

La disminución de la expresión de 5-HT_{2C} en el PVN constituye igualmente un resultado de gran interés, dada la importancia de este núcleo en el control del eje

HPA. Este hallazgo sugiere que la capacidad excitatoria del receptor 5-HT_{2C} sobre las neuronas que liberan el CRF en el PVN demostrada recientemente (Heisler y cols, 2007) debe ser menor en los animales carentes del receptor CB₁. Estos datos contrastan con los niveles elevados de glucocorticoides observados en estos animales cuando son expuestos al estrés (**Artículo 1**), y sugieren que el efecto que produce la ausencia del control inhibitorio del receptor CB₁ sobre el eje HPA en los ratones mutantes prevalece sobre la menor estimulación de la liberación de CRF inducida por el receptor 5-HT_{2C} en estos animales.

Del mismo modo, destaca la menor expresión del receptor 5-HT_{2C} en el núcleo *accumbens* de los animales mutantes revelada por nuestros resultados. El receptor 5-HT_{2C} inhibe indirectamente, a través de la estimulación de las neuronas GABAérgicas, la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* (Dremencov y cols, 2005), que es un elemento clave en los procesos que regulan la motivación (Camí y Farré, 2003). La menor actividad del receptor 5-HT_{2C} en esta área en los ratones carentes del receptor CB₁ podría implicar una mayor liberación de dopamina en dicha estructura límbica, que contrastaría con la anhedonia manifestada por estos mutantes que hemos descrito en estudios previos (Martín y cols, 2002). Esta aparente controversia sugiere que el receptor CB₁ afecta los circuitos de motivación y recompensa regulando de forma distinta dos mecanismos con efectos opuestos. Uno de estos mecanismos sería la inhibición indirecta de la liberación de dopamina producida por el receptor 5-HT_{2C} y el otro sería el control sobre las aferencias excitatorias e inhibitorias de las neuronas dopaminérgicas que facilita la liberación de dopamina en respuesta a estímulos reforzantes (Maldonado y cols, 2006). Considerando el fenotipo depresivo manifestado por los animales mutantes, la ausencia del receptor CB₁ haría que predominase la alteración de este segundo mecanismo frente a la del primero y se produjera una deficiencia en los circuitos de motivación y recompensa pudiendo producirse un estado anhedónico.

Contrariamente a lo observado en otras regiones cerebrales, la **expresión del receptor 5-HT_{2C}** se encuentra **incrementada en el hipocampo** ventral en los animales carentes del receptor CB₁. Este hallazgo nos sugiere un papel diferencial desarrollado por el receptor 5-HT_{2C} en el hipocampo, que merecería una atención especial. En este sentido, estamos desarrollando un estudio sobre la localización del receptor 5-HT_{2C} en las diferentes poblaciones neuronales existentes en el hipocampo ventral, con el fin de elucidar las posibles implicaciones de esta sobreexpresión del receptor 5-HT_{2C} en la funcionalidad del hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁.

Considerando en general los resultados obtenidos sobre la interacción de los sistemas cannabinoide y serotoninérgico, podríamos concluir que la ausencia de actividad del receptor CB₁ induce una desregulación de la neurotransmisión serotoninérgica a diferentes niveles cuya consecuencia es un aumento de los niveles extracelulares de 5-HT. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Tzavara y cols (2003) que revelan que el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ induce una elevación de los niveles de 5-HT en la corteza frontal de la rata. En el caso los animales carentes del receptor CB₁, el incremento de los niveles de 5-HT se asocia con una menor funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} y del 5-HTT, todos ellos componentes inhibitorios de la retroalimentación serotoninérgica. No obstante, estas observaciones contrastan con el fenotipo de tipo depresivo manifestado por los animales que carecen del receptor CB₁, ya que la depresión ha sido clásicamente asociada a una deficiencia serotoninérgica (Charney, 1998). Desde nuestro punto de vista, esta **aparente controversia** nos indica que la ausencia del receptor CB₁ induce en paralelo alteraciones en dos mecanismos que afectan al estado emocional. i) Por un lado, produce un **incremento** de los **niveles de 5-HT** y modificaciones en diferentes componentes serotoninérgicos, que pueden ser comparables a las descritas tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Le Poul y cols, 2000; Lanfumey y cols, 2000; Gould y cols, 2006). ii) Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, la ausencia del receptor CB₁ produce un **incremento** en la **liberación de glucocorticoides** en respuesta al estrés que induce una disminución de los niveles de BDNF en el hipocampo. Esta alteración de la plasticidad neuronal puede comprometer la función de dicha estructura. Teniendo en cuenta el control inhibitorio que ejerce el hipocampo sobre el eje HPA, una alteración de la funcionalidad de esta estructura puede inducir una retroalimentación positiva en la liberación de glucocorticoides que potencie las consecuencias patológicas. Así, las alteraciones en la regulación de la respuesta al estrés y en los niveles de BDNF inducidas por la ausencia del receptor CB₁ prevalecerían sobre las modificaciones de la transmisión serotoninérgica tras un periodo prolongado de tiempo, desencadenando la manifestación de síntomas depresivos como los descritos en los animales mutantes (**Artículo 1**). Además, la señalización serotoninérgica postsináptica parece estar alterada en los animales mutantes (**Artículo 2**), con lo que el supuesto efecto antidepresivo que podría ejercer el incremento de actividad serotoninérgica se vería reducido. Este planteamiento apoya las recientes hipótesis postuladas sobre la neurobiología de la depresión según las cuales los mecanismos claves en la fisiopatología de la depresión serían la existencia de una desregulación de los mecanismos que modulan la respuesta al estrés, alteraciones en la plasticidad neuronal y

deficiencias en los circuitos de recompensa. De esta manera, las monoaminas son consideradas como elementos moduladores de otros sistemas neurobiológicos y tendrían principalmente una función mediadora de los efectos de los antidepresivos, en lugar de desempeñar un papel crucial en la etiología de la depresión (Heninger y cols, 1996; Berton y Nestler, 2006).

No obstante, no podemos descartar que el incremento de los niveles extracelulares de 5-HT observados en los animales carentes del receptor CB₁, tenga alguna relación con las deficiencias descritas a nivel del BDNF hipocampal, como se ha comentado anteriormente. Esta posibilidad se fundamenta en el hecho de que el estrés puede inducir un incremento de la liberación de 5-HT que promueve la disminución de la expresión de BDNF en el hipocampo a través de la activación del receptor 5-HT_{2A} (Vaidya y cols, 1999). Así, en los animales mutantes la respuesta exagerada al estrés y los niveles elevados de 5-HT podrían sobreactivar el receptor 5-HT_{2A} en el hipocampo, donde no parece tener alterada su funcionalidad (**Artículo 2**). De esta manera, los niveles elevados de 5-HT participarían en la deficiencia de BDNF que contribuye de forma fundamental al fenotipo de tipo depresivo que hemos descrito en estos animales.

Participación del sistema endocannabinoide en los trastornos de ansiedad y en el síndrome de abstinencia asociados al consumo de nicotina

El consumo de tabaco puede generar dependencia debido fundamentalmente a las propiedades adictivas de la nicotina, el principal componente psicoactivo del tabaco. Entre las causas que facilitan el desarrollo de la adicción al tabaco destacan la capacidad de la nicotina para regular los niveles de ansiedad y el estrés de los fumadores (Pomerleau y Pomerleau, 1990) y la aparición de un síndrome de abstinencia tras el cese del consumo, que se caracteriza por la manifestación de signos somáticos y disfóricos (Kenny y Markou, 2001). En la presente Tesis Doctoral hemos abordado la función que desempeña el sistema endocannabinoide en el control de ambos procesos.

En primer lugar, hemos analizado la participación del sistema endocannabinoide en las manifestaciones físicas y afectivas de la abstinencia de nicotina en el ratón (**Artículo 4**). Con el fin de evaluar la función del sistema endocannabinoide en la dependencia física de nicotina, hemos administrado el agonista cannabinoide Δ^9 -THC en animales dependientes de nicotina para posteriormente precipitar la abstinencia mediante la administración de un antagonista nicotínico (mecamilamina, 1 mg/kg) o de un antagonista opioide (naloxona, 3 mg/kg). La evaluación del síndrome de abstinencia de nicotina se realizó mediante la

cuantificación de los signos somáticos manifestados por los animales, como había sido descrito con anterioridad (Isola y cols, 1999; Watkins y cols, 2000). La severidad de la abstinencia revelada por los animales dependientes de nicotina es mayor tras el bloqueo de los receptores nicotínicos que tras la administración del antagonista opioide, de acuerdo con estudios previos (Watkins y cols, 2000). Independientemente del antagonista utilizado para precipitar la abstinencia de nicotina, el tratamiento previo con el agonista cannabinoide Δ^9 -THC (0.3, 1 y 3 mg/kg) **reduce** las **manifestaciones somáticas** de dicha **abstinencia**. Estos resultados demuestran que la expresión somática de la abstinencia de nicotina puede ser aliviada mediante la activación exógena del sistema endocannabinoide. Con objeto de analizar si estas propiedades del Δ^9 -THC están asociadas a posibles cambios adaptativos en los receptores CB₁ producidos por la exposición crónica a la nicotina, se ha evaluado la densidad y funcionalidad de estos receptores en el cerebro de los animales dependientes de nicotina. Nuestros resultados demuestran que no existen modificaciones ni en la densidad ni en la capacidad de acoplamiento a las proteínas G de los receptores CB₁ en ninguna de las estructuras estudiadas, de acuerdo con los resultados publicados con anterioridad en ratas dependientes de nicotina (González y cols, 2002). En definitiva, nuestros resultados permiten concluir que el sistema endocannabinoide participa en la expresión de la abstinencia de nicotina, puesto que la activación del receptor CB₁ atenúa las manifestaciones de dicha abstinencia. Sin embargo, las manifestaciones somáticas de la abstinencia de nicotina no están alteradas en ratones carentes del receptor CB₁ (Castañé y cols, 2002), sugiriendo un papel diferencial de este receptor en el desarrollo y en la expresión de la abstinencia de esta droga. De todas formas, no es posible descartar que las diferentes estrategias experimentales utilizadas en el trabajo de Castañé y cols (2002) y el presente estudio puedan influir en la interpretación de los resultados.

Nuestros resultados demuestran igualmente la participación del sistema endocannabinoide en el componente emocional negativo de la abstinencia de nicotina. Así, la administración del agonista cannabinoide Δ^9 -THC (0.3 mg/kg) **bloquea** la **disforia** inducida por la **abstinencia de nicotina** (**Artículo 4**). Para poder revelar estos resultados, hemos puesto a punto un modelo basado en el paradigma del condicionamiento espacial que nos permite evaluar el componente emocional de la abstinencia de nicotina en el ratón. Para ello, se condiciona a los ratones dependientes de nicotina con diferentes dosis de mecamilamina (0.3 y 1 mg/kg) o de naloxona (0.12 mg/kg) en compartimientos espaciales bien diferenciados de manera que puedan asociar el ambiente en el que reciben el antagonista con la disforia inducida por la abstinencia de nicotina. En nuestras

condiciones experimentales, la naloxona origina una aversión hacia el lugar en el que los animales han sido condicionados con el antagonista, indicando que este antagonista precipita manifestaciones motivacionales negativas de la abstinencia en los animales dependientes de nicotina. La mecamilamina, en cambio, no induce este comportamiento aversivo. Estos resultados indican una disociación entre el componente emocional disfórico de la abstinencia de nicotina, en el que el sistema opioide participa de manera determinante, y el componente somático, en el que el sistema colinérgico tiene una mayor relevancia.

La abstinencia de nicotina ha sido asociada a una disminución de la liberación de dopamina y a un ligero incremento en los niveles de acetilcolina en el núcleo *accumbens* (Rada y cols, 2001). En este sentido, la atenuación de las manifestaciones físicas y emocionales de la abstinencia de esta droga inducida por el Δ^9 -THC y demostrada por nuestros resultados podría deberse a la capacidad del agonista cannabinoide de incrementar los niveles de dopamina en esta estructura (Tanda y cols, 1997) y de disminuir la liberación de acetilcolina (Gessa y cols, 1998). Sin embargo, es posible que además el Δ^9 -THC influya sobre las manifestaciones emocionales aversivas de la abstinencia de nicotina modulando los niveles de ansiedad, ya que se ha descrito un efecto ansiolítico del Δ^9 -THC a la dosis que hemos utilizado (Valjent y cols, 2002).

Por último, hemos analizado la participación del sistema endocannabinoide en los efectos inducidos por la nicotina sobre los niveles de ansiedad (**Artículo 5**). Existen numerosos trabajos que abordan el efecto de la nicotina sobre la ansiedad, tanto en humanos como en animales que reflejan la complejidad de los procesos implicados en estas respuestas. Así, la nicotina puede inducir tanto un efecto ansiolítico como ansiogénico, dependiendo de la dosis entre otros factores (Picciotto y cols, 2002). En un trabajo previo, evaluamos las diferentes dosis de nicotina que modulan la ansiedad en el ratón mediante la utilización del laberinto elevado en cruz, determinando que una dosis baja (0.05 mg/kg) produce un efecto ansiolítico mientras que una dosis alta (0.8 mg/kg) incrementa los niveles de ansiedad de los ratones (Balerio y cols, 2005). Además, en este mismo trabajo comprobamos que los efectos de la nicotina sobre la ansiedad son mediados por la activación de los receptores nAChRs. Partiendo de las mismas condiciones experimentales, en el presente trabajo hemos observado que la administración del antagonista del receptor CB₁ **rimonabant bloquea** el efecto **ansiolítico** de la **nicotina** y **potencia** la **ansiógénesis** inducida por una dosis elevada de la misma, sin que dicho antagonista (0.25, 0.5 y 1 mg/kg) produzca ninguna alteración *per se* de los niveles de ansiedad de los animales. En cambio, el agonista cannabinoide **Δ^9 -THC**, administrado a una dosis que no tiene efecto sobre

la ansiedad (0.1 mg/kg), **atenúa** los efectos **ansiogénicos** de la dosis alta de **nicotina** sin modificar sus efectos ansiolíticos. Además, la **administración conjunta** de dosis subefectivas de Δ^9 -THC (0.1 mg/kg) y de **nicotina** (0.025 mg/kg) produce un claro efecto **ansiolítico** en los animales. En conjunto, estos resultados demuestran que la actividad del receptor CB₁ desempeña una función importante en la modulación que ejerce la nicotina sobre los niveles de ansiedad, aliviando los efectos ansiogénicos de dosis elevadas de nicotina y facilitando los efectos ansiolíticos de dosis bajas de esta sustancia. Esta propiedad del receptor CB₁ para atenuar las manifestaciones ansiogénicas de la nicotina puede deberse a su capacidad para inhibir la liberación de algunos neurotransmisores como el glutamato o la noradrenalina (Schlicker y Kathmann, 2001) que son liberados tras la administración de dosis altas de nicotina (Toth y cols, 1992; Fu y cols, 1998).

En general, considerando los resultados obtenidos sobre la participación del sistema endocannabinoide en las manifestaciones de los trastornos de ansiedad y depresión, podemos afirmar que el receptor CB₁ participa de forma determinante en la recuperación del balance homeostático del individuo tras la exposición a un estímulo emocional negativo, bien sea la exposición a un situación estresante o bien una droga que produce abstinencia o que incrementa los niveles de ansiedad.

CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La ausencia del receptor CB₁ induce un fenotipo de tipo depresivo en el ratón. Las manifestaciones de tipo depresivo se producen (1) a nivel comportamental, con un incremento de la conducta de desespero ante una situación de estrés incontrolable, (2) a nivel neuroendocrino, con una liberación elevada de glucocorticoides en respuesta al estrés y (3) a nivel neuroquímico, con una deficiencia en los niveles de BDNF en el hipocampo.
2. La deficiencia de BDNF en el hipocampo de los animales carentes del receptor CB₁ es crucial en las manifestaciones depresivas de estos animales por cuanto la administración local de este factor neurotrófico revierte de manera completa el fenotipo depresivo de los mutantes. Estas evidencias sustentan el papel decisivo del hipocampo en el desarrollo de los síntomas depresivos, ya que a su vez esta estructura ejerce un control del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y participa de las alteraciones cognitivas que acontecen en la depresión.
3. El bloqueo genético del receptor CB₁ produce alteraciones en la actividad del sistema serotoninérgico, que clásicamente ha sido relacionado con el control del humor y de las respuestas emocionales. Así, los animales carentes del receptor CB₁ presentan niveles elevados de 5-HT en la corteza prefrontal asociados a alteraciones en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} en el núcleo del rafe dorsal y del transportador de 5-HT en la corteza prefrontal.
4. El estudio farmacológico y bioquímico de la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} indica que puede existir una deficiencia en la señalización serotoninérgica postsináptica de los animales carentes del receptor CB₁.
5. El sistema endocannabinoide participa en los efectos inducidos por la nicotina sobre la ansiedad y en la expresión del síndrome de abstinencia de esta droga. Así, la actividad del receptor CB₁ alivia los efectos ansiogénicos de dosis elevadas de nicotina y facilita los efectos ansiolíticos de dosis bajas. Además, la administración del agonista cannabinoide Δ⁹-THC atenúa

las manifestaciones somáticas y emocionales de la abstinencia de la nicotina.

6. Nuestros resultados muestran diferentes situaciones en las que el receptor CB_1 participa de forma determinante en la recuperación del balance homeostático del individuo ante un estímulo emocional negativo, como son la exposición a una situación estresante aguda o crónica, la ansiedad inducida por la nicotina y la disforia producida por la abstinencia de esta droga.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Adams JB, Pyke RE, Costa J, Cutler NR, Schweizer E, Wilcox CS, Wisselink PG, Greiner M, Pierce MW, Pande AC (1995) A double-blind, placebo-controlled study of a CCK-B receptor antagonist, CI-988, in patients with generalized anxiety disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 15:428-434.
 - Ameri, A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, 58:315-348.
 - Ashton JC (2007) Cannabinoids for the treatment of inflammation. *Curr Opin Investig Drugs*, 8:373-384.
 - Bab I, Zimmer A (2008) Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol*, 153:182-188.
 - Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 27: 1-4.
 - Balerio GN, Aso E, Maldonado R (2005) Involvement of the opioid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 181:260-269.
 - Bambico FR, Katz N, Debonnel G, Gobbi G (2007) Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, 27:11700-11711.
 - Barna I, Zelena D, Arszovszki AC, Ledent C (2004) The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB₁ receptor knockout mice. *Life Sci*, 75:2959-2970.
 - Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38:1083-1152.
 - Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V, Nestler EJ (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioural responses to emotional stimuli. *PNAS*, 99(17):11435-11440.
 - Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Muñoz AL, Fuentes E, Juan-Pico P, Castro MJ, Milman G, Mechoulam R, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F (2008) Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia*, 51:476-487.
 - Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311:864-868.
 - Berton O, Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, 7:137-151.

- Best AR, Regehr WG (2008) Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci*, 28:6508-6515.
- Bilkei-Gorzo A, Racz I, Valverde O, Otto M, Michel K, Sastre M, Zimmer A (2005) Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB₁ receptors. *PNAS*, 102:15670-15675.
- Blendy JA (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, 59:1144-1150.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem J*, 312:637-641.
- Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T (2006) *In vivo* evidence that 5-HT(2C) receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol*, 149:861-869.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS (1996a) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: II. Clinical studies. *Synapse*, 23:39-51.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS (1996b) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse*, 23:28-38.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*, 157:115-118.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 152:567-575.
- Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F (2008) CB₂ receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol*, 153:240-251.
- Cahill K, Ussher M (2007) Cannabinoid type 1 receptor antagonists (rimonabant) for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, 4:CD005353.
- Camí J, Farré M. (2003) Drug addiction. *N Engl J Med*, 349:975-986.
- Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci*, 28:436-445.
- Castañé A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002) Lack of CB₁ cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology*, 43:857-867.
- Castañé A, Berrendero F, Maldonado R (2005) The role of the cannabinoid system in nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 81:381-386.
- Castrén E (2004) Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol*, 4:58-64.

-
- Celada P, Puig M, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F (2004) The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci*, 29:252-265.
 - Charney DS, Redmond DE Jr (1983) Neurobiological mechanisms in human anxiety. Evidence supporting central noradrenergic hyperactivity. *Neuropharmacology*, 22:1531-1536.
 - Charney DS (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry*, 59 Suppl 14:11-14.
 - Cheer JF, Cadogan AK, Marsden CA, Fone KC, Kendall DA (1999) Modification of 5-HT₂ receptor mediated behaviour in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors. *Neuropharmacology*, 38:533-541.
 - Cheeta S, Kenny PJ, File SE (2000) The role of 5HT_{1A} receptors in mediating the anxiogenic effects of nicotine following lateral septal administration. *Eur J Neurosci*, 12:3797-3802.
 - Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, 50:260-265.
 - Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo PE (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 29:37-76.
 - Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrié P (2002) SR141716, a central cannabinoid (CB₁) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behav Pharmacol*, 13:451-463.
 - Cohen C, Kodas E, Griebel G (2005) CB₁ receptor antagonists for the treatment of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 81:387-395.
 - Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA (2002) cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci*, 22:3262-8.
 - Cools R, Roberts AC, Robbins TW (2008) Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci*, 12:31-40.
 - Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112:423-431.
 - Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grübler Y, Stalla J, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2007) Requirement of cannabinoid

- receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology*, 148:1574-81.
- Cota D (2008) The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol*, 20:35-38.
 - Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty acid amides. *Nature*, 384: 83-87.
 - Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 23:238-245.
 - Damaj MI, Kao W, Martin BR (2003) Characterization of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 307:526-534.
 - Dani JA, Heinemann S (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*, 16:905-908.
 - Dani JA, Bertrand D (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:699-729.
 - Darmani NA, Janoyan JJ, Kumar N, Crim JL (2003) Behaviorally active doses of the CB₁ receptor antagonist SR 141716A increase brain serotonin and dopamine levels and turnover. *Pharmacol Biochem Behav*, 75:777-787.
 - Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol*, 583:272-89.
 - De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19:269-301.
 - De Vry J (1995) 5HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl)*, 121:1-26.
 - Decker MW, Rueter LE, Bitner RS (2004) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics. *Curr Top Med Chem*, 4:369-384.
 - Degenhardt L, Hall W, Lynskey M (2003) Exploring the association between cannabis use and depression. *Addiction*, 98:1493-1504.
 - Degroot A, Nomikos GG (2007) In vivo neurochemical effects induced by changes in endocannabinoid neurotransmission. *Curr Opin Pharmacol*, 7:62-68.
 - Devane, WA, Dysarz, FA, Johnson, MR, Melvin, LS, Howlett, AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34:605-613.

-
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258:1946-1949.
 - Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372:686-691.
 - Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*, 8:585-589.
 - Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, 23:4850-4857.
 - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition (DSM-IV) Text Revision (2005) American Psychiatric Association, Washington D.C.
 - Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *PNAS*, 99:10819-10824.
 - Dremencov E, Newman ME, Kinor N, Blatman-Jan G, Schindler CJ, Overstreet DH, Yadid G (2005) Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. *Neuropharmacology*, 48(1):34-42.
 - Dremencov E, Weizmann Y, Kinor N, Gispán-Herman I, Yadid G (2006) Modulation of dopamine transmission by 5-HT_{2C} and 5-HT₃ receptors: a role in the antidepressant response. *Curr Drug Targets*, 7:165-175.
 - Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59:1116-1127.
 - Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 60:804-815.
 - Dwivedi Y, Rizavi HS, Pandey GN (2006) Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neuroscience*, 139:1017-29.
 - Egashira N, Mishima K, Katsurabayashi S, Yoshitake T, Matsumoto Y, Ishida J, Yamaguchi M, Iwasaki K, Fujiwara M (2002) Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory. *Eur J Pharmacol*, 445:221-229.

- Emilien G, Maloteaux JM (1998) Current therapeutic uses and potential of beta-adrenoceptor agonists and antagonists. *Eur J Clin Pharmacol*, 53:389-404.
- Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A (1998) Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature* 393:76-79.
- Fernández A, Haro JM, Martínez-Alonso M, Demyttenaere K, Brugha TS, Autonell J, de Girolamo G, Bernert S, Lépine JP, Alonso J (2007) Treatment adequacy for anxiety and depressive disorders in six European countries. *Br J Psychiatry*, 190:172-173.
- Fernández-Ruiz J, González S (2005) Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol*, 168:479-507.
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M (2007) Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci*, 28:39-45.
- File SE (2000) NKP608, an NK1 receptor antagonist, has an anxiolytic action in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 152:105-109.
- File SE, Cheeta S, Kenny PJ (2000) Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol*, 393:231-236.
- File SE, Cheeta S, Irvine EE, Tucci S, Akthar M (2002) Conditioned anxiety to nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*, 164:309-317.
- Filliol D, Ghazizadeh S, Chluba J, Martín M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet*, 25:195-200.
- Forget B, Barthélémy S, Saurini F, Hamon M, Thiébot MH (2006) Differential involvement of the endocannabinoid system in short- and long-term expression of incentive learning supported by nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 189:59-69.
- Fowler CJ (2005) Pharmacological properties and therapeutic possibilities for drugs acting upon endocannabinoid receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4:685-696.
- Fu Y, Matta SG, James TJ, Sharp BM (1998) Nicotine-induced norepinephrine release in the rat amygdala and hippocampus is mediated through brainstem nicotinic cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 284:1188-1196.
- Fuchs E, Flugge G (2004) Animal models of anxiety disorders. En: Charney DS, Nestler EJ, eds. *Neurobiology of Mental Illness*. New York: Oxford University Press, pp. 546-557.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral

- cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232:54-61.
- Garlow SJ, Nemeroff CB (2004) The neurochemistry of depressive disorders: clinical studies. En: Charney DS, Nestler EJ, eds. *Neurobiology of Mental Illness*. New York: Oxford University Press, pp. 440-460.
 - Gessa GL, Casu MA, Carta G, Mascia MS (1998) Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol*, 355:119-124.
 - Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D (2005) Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *PNAS*, 102:18620-18625.
 - González S, Cascio MG, Fernández-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res*, 954:73-81.
 - Gorman JM (1996) Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety*, 4:160-168.
 - Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD (2000) Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am J Psychiatry*, 157:493-505.
 - Gould GG, Altamirano AV, Javors MA, Frazer A (2006) A comparison of the chronic treatment effects of venlafaxine and other antidepressants on serotonin and norepinephrine transporters. *Biol Psychiatry*, 59:408-414.
 - Griebel G (1999) Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther*, 82:1-61.
 - Griebel G, Stemmelin J, Scatton B (2005) Effects of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry*, 57:261-267.
 - Gutman DA, Nemeroff CB (2003) Persistent central nervous system effects of an adverse early environment: clinical and preclinical studies. *Physiol Behav*, 79:471-478.
 - Guyenet PG, Aghajanian GK (1977) Excitation of neurons in the nucleus locus coeruleus by substance P and related peptides. *Brain Res*, 136:178-184.
 - Haass M, Kübler W (1997) Nicotine and sympathetic neurotransmission. *Cardiovasc Drugs Ther*, 10:657-665.
 - Hájos N, Freund TF (2002) Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers. *Neuropharmacology*, 43:503-510.

- Hall W, Solowij N (1998) Adverse effects of cannabis. *Lancet*, 352:1611-1616.
- Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB₁ cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci*, 16:1395-1398.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF (2004) CB₁ cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB₁-specific agents. *Behav Pharmacol*, 15:299-304.
- Haller J, Mikics E, Makara GB (2008) The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol*, 29:273-291.
- Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, Ikonomidou C, Schmid HH, Fernández-Ruiz JJ, Hansen HS (2001) Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem*, 78:1415-1427.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam, R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *PNAS*, 98:3662-3665.
- Harro J, Orelund L (2001) Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Brain Res Rev*, 38:79-128.
- Harro J (2006) CCK and NPY as anti-anxiety treatment targets: promises, pitfalls, and strategies. *Amino Acids*, 31:215-230.
- Heisler LK, Pronchuk N, Nonogaki K, Zhou L, Raber J, Tung L, Yeo GS, O'Rahilly S, Colmers WF, Elmquist JK, Tecott LH (2007) Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci*, 27:6956-6964.
- Heninger GR, Delgado PL, Charney DS (1996) The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*, 29:2-11.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11:563-583.
- Hildebrand BE, Nomikos GG, Hertel P, Schilstrom B, Svensson TH (1998) Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res*, 779:214-225.

-
- Hill MN, Gorzalka BB (2005a) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol*, 16:333-52.
 - Hill MN, Gorzalka BB (2005b) Pharmacological enhancement of cannabinoid CB₁ receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15:593-599.
 - Hill MN, Ho WS, Sinopoli KJ, Viau V, Hillard CJ, Gorzalka BB (2006a) Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*, 31:2591-2599.
 - Hill MN, Sun JC, Tse MT, Gorzalka BB (2006b) Altered responsiveness of serotonin receptor subtypes following long-term cannabinoid treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 9:277-286.
 - Hill MN, Miller GE, Ho WS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2008) Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry*, 41:48-53.
 - Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 147:1-46.
 - Hökfelt T, Broberger C, Diez M, Xu ZQ, Shi T, Kopp J, Zhang X, Holmberg K, Landry M, Koistinaho J (1999) Galanin and NPY, two peptides with multiple putative roles in the nervous system. *Horm Metab Res*, 31:330-334.
 - Hökfelt T, Bartfai T, Bloom F (2003) Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 2:463-72.
 - Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, Steckler T, Griebel G (2003) Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 24:580-588.
 - Holsboer F (2001) Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*, 62:77-91.
 - Holsboer F, Ising M (2008) Central CRH system in depression and anxiety-evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 583:350-357.
 - Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54:161-202.
 - Howlett AC (2005) Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*, 168:53-79.

- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24:677-736.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *PNAS*, 99:8400-8405.
- Hughes JR (2007) Effects of abstinence from tobacco: valid symptoms and time course. *Nicotine Tob Res*, 9:315-327.
- Illes P, Finta EP, Nieber K (1993) Neuropeptide Y potentiates via Y2-receptors the inhibitory effect of noradrenaline in rat locus coeruleus neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 348:546-548.
- Isola R, Vogelsberg V, Wemlinger TA, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1999) Nicotine abstinence in the mouse. *Brain Res*, 850:189-196.
- Jacobsen JP, Mørk A (2006) Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat. *Brain Res*, 1110:221-225.
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA (2004) Defective adult neurogenesis in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, 66:204-208.
- Joëls M (2008) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 583:312-321.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci*, 31:1-7.
- Kalueff AV, Nutt DJ (2007) Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety*, 24:495-517.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10:381-391.
- Kask A, Harro J, von Hörsten S, Redrobe JP, Dumont Y, Quirion R (2002) The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev*, 26:259-283.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*, 9:76-81.
- Katner SN, Davis SA, Kirsten AJ, Taffe MA (2004) Effects of nicotine and mecamylamine on cognition in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 175:225-240.

-
- Keller M, Montgomery S, Ball W, Morrison M, Snavely D, Liu G, Hargreaves R, Hietala J, Lines C, Beebe K, Reines S (2006) Lack of efficacy of the substance p (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 59:216-223.
 - Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*, 156:837-41.
 - Kenny PJ, Markou A (2001) Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav*, 70:531-549.
 - Kent JM, Mathew SJ, Gorman JM (2002) Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biol Psychiatry*, 52:1008-1030.
 - Kessler RC, Wang PS (2008) The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. *Annu Rev Public Health*, 29:115-129.
 - Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2004) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci*, 19:1691-1698.
 - Klein TW, Cabral GA (2006) Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1:50-64.
 - Knoll AT, Meloni EG, Thomas JB, Carroll FI, Carlezon WA Jr (2007) Anxiolytic-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 323:838-845.
 - Koethe D, Llenos IC, Dulay JR, Hoyer C, Torrey EF, Leweke FM, Weis S (2007) Expression of CB₁ cannabinoid receptor in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *J Neural Transm*, 114:1055-1063.
 - Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, Preskorn SH, Rothschild AJ, Snavely D, Ghosh K, Ball WA, Reines SA, Munjack D, Apter JT, Cunningham L, Kling M, Bari M, Getson A, Lee Y (2004) Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. *Neuropsychopharmacology*, 29:385-392.
 - Lanfumey L, Pardon MC, Laaris N, Joubert C, Hanoun N, Hamon M, Cohen-Salmon C (1999) 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport*, 10:3369-3374.
 - Lanfumey L, Mannoury la Cour C, Froger N, Hamon M (2000) 5-HT-HPA interactions in two models of transgenic mice relevant to major depression. *Neurochem Res*, 25:1199-1206.

- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *PNAS*, 105:2699-2704.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science*, 283:401-404.
- Le Foll B, Forget B, Aubin HJ, Goldberg SR (2008) Blocking cannabinoid CB₁ receptors for the treatment of nicotine dependence: insights from pre-clinical and clinical studies. *Addict Biol*, 13:239-252.
- Lesch KP, Mössner R (2006) Inactivation of 5HT transport in mice: modeling altered 5HT homeostasis implicated in emotional dysfunction, affective disorders, and somatic syndromes. *Handb Exp Pharmacol*, 175:417-456.
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M, Lanfumey L (2000) Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology*, 39:110-122.
- Leuner B, Gould E, Shors TJ (2006) Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, 16:216-224.
- Lever IJ, Rice AS (2007) Cannabinoids and pain. *Handb Exp Pharmacol*, 177:265-306.
- Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, Zhang Y, Stevens WC Jr, Jones RM, Portoghese PS, Carlezon WA Jr (2003) Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 305:323-330.
- Mahler SV, Smith KS, Berridge KC (2007) Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*, 32:2267-2278.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*, 29:225-232.
- Mangieri RA, Piomelli D (2007) Enhancement of endocannabinoid signaling and the pharmacotherapy of depression. *Pharmacol Res*, 56:360-366.
- Mansvelder HD, McGehee DS (2002) Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol*, 53:606-617.
- Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA (1999) Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res*, 839:173-179.

-
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418:530-534.
 - Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB₁ cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302:84-88.
 - Martín M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002) Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*, 159:379-387.
 - Mathew SJ, Amiel JM, Coplan JD, Fitterling HA, Sackeim HA, Gorman JM (2005) Open-label trial of riluzole in generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry*, 162:2379-2381.
 - Mathew SJ, Manji HK, Charney DS (2008) Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 33:2300.
 - Mathew SJ, Price RB, Charney DS (2008) Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 148:89-98.
 - Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346:561-564.
 - Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*, 327:535-550.
 - McEwen BS (2005) Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*, 54:20-23.
 - McKinney WT (2001) Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 6:68-78.
 - Mechoulam R, Gaoni Y (1965) A total synthesis of DL-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*, 87:3273-3275.
 - Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50:83-90.

- Merritt LL, Martin BR, Walters C, Lichtman AH, Damaj MI (2008) The endogenous cannabinoid system modulates nicotine reward and dependence. *J Pharmacol Exp Ther*, 326:483-492.
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 70:83-244.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28:223-250.
- Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G (2007) Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*, 370:319-328.
- Morgan CA 3rd, Wang S, Southwick SM, Rasmusson A, Hazlett G, Hauger RL, Charney DS (2000) Plasma neuropeptide-Y concentrations in humans exposed to military survival training. *Biol Psychiatry*, 47:902-909.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365:61-65.
- Murillo-Rodríguez E (2008) The role of the CB₁ receptor in the regulation of sleep. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32:1420-1427.
- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E (2000) Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 361:19-24.
- Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC (2001) Serotonin, acetylcholine and histamine. En: *Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience*. New York: McGraw Hill Companies, pp. 191-211.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002a) Neurobiology of depression. *Neuron*, 34:13-25.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Bunce M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S (2002b) Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*, 52:503-28.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*, 59:1151-1159.
- Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chem Rev*, 108:1614-1641.
- Nutt DJ, Kessler RC, Alonso J, Benbow A, Lecrubier Y, Lépine JP, Mechanic D, Tylee A (2007) Consensus statement on the benefit to the community of ESEMeD (European Study of the Epidemiology of Mental Disorders) survey data on depression and anxiety. *J Clin Psychiatry*, 68 Suppl 2:42-48.

-
- Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T (2008) 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: A Possible Natural Ligand for GPR55. *J Biochem*, Oct 9.
 - Onaivi ES, Green MR, Martin BR (1990) Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther*, 253:1002-1009.
 - O'Neill AB, Brioni JD (1994) Benzodiazepine receptor mediation of the anxiolytic-like effect of (-)-nicotine in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 49:755-757.
 - Panagis G, Hildebrand BE, Svensson TH, Nomikos GG (2000) Selective c-fos induction and decreased dopamine release in the central nucleus of amygdala in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Synapse*, 35:15-25.
 - Pande AC, Greiner M, Adams JB, Lydiard RB, Pierce MW (1999) Placebo-controlled trial of the CCK-B antagonist, CI-988, in panic disorder. *Biol Psychiatry*, 46: 860–862.
 - Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, 413:527-531.
 - Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Increased severity of stroke in CB₁ cannabinoid receptor knock-out mice. *J Neurosci*, 22:9771-9775.
 - Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ (2004) Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 145:5431-5438.
 - Patel S, Hillard CJ (2008) Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci*, 27:2821-2829.
 - Paulus MP, Stein MB (2006) An insular view of anxiety. *Biol Psychiatry*, 60:383-387.
 - Pertwee RG (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*, 48:859-867.
 - Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 168:1-51.
 - Pertwee RG (2008) Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamida and beyond. *Addict Biol*, 13:147-159.
 - Picciotto MR, Zoli M, Lena C, Bessis A, Lallemand Y, Le Novere N, Vincent P, Pich EM, Brulet P, Changeux JP (1995) Abnormal avoidance learning in mice

- lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, 374:65-67.
- Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ (2002) Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 13:1097-1106.
 - Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*, 256:377-380.
 - Piomelli, D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4:873-884.
 - Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J; RIO-North America Study Group (2006) Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*, 295:761-775.
 - Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33:88-109.
 - Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2001) Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci*, 21:7397-7403.
 - Pomerleau OF, Pomerleau CS (1990) Behavioural studies in humans: anxiety, stress and smoking. *Ciba Found Symp*, 152:225-235.
 - Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266:730-732.
 - Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301:1020-1024.
 - Pryor GT, Larsen FF, Husain S, Braude MC (1978) Interactions of delta9-tetrahydrocannabinol with d-amphetamine, cocaine, and nicotine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 8:295-318.
 - Rada P, Jensen K, Hoebel BG (2001) Effects of nicotine and mecamylamine-induced withdrawal on extracellular dopamine and acetylcholine in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)*, 157:105-110.
 - Razdan RK (1986) Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol Rev*, 38:75-149.

-
- Ressler KJ, Mayberg HS (2007) Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci*, 10:1116-1124.
 - Riedel G, Davies SN (2005) Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol*, 168:445-477.
 - Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martínez S, Maruani J, Neliat G, Caput D (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, 350:240-244.
 - Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC, Le Fur GL (1998) SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 284:644-650.
 - Robbe D, Alonso G, Chaumont S, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Role of p/q-Ca²⁺ channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long-term depression at nucleus accumbens synapses. *J Neurosci*, 22:4346-4356.
 - Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermúdez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*, 40:2-14.
 - Rossato M, Pagano C, Vettor R (2008) The cannabinoid system and male reproductive functions. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1:90-93.
 - Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Viganó D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D (2008) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 18:1292-1301.
 - Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152:1092-1101.
 - Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 25:1089-1094.
 - Sanchís-Segura C, Cline BH, Marsicano G, Lutz B, Spanagel R (2004) Reduced sensitivity to reward in CB₁ knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 176:223-232.
 - Santarelli L, Gobbi G, Blier P, Hen R (2002) Behavioral and physiologic effects of genetic or pharmacologic inactivation of the substance P receptor (NK1). *J Clin Psychiatry*, 63 Suppl 11:11-17.

- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301:805-809.
- Sapolsky RM (2000) The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry*, 48:755-765.
- Sapolsky RM (2003) Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res*, 28:1735-1742.
- Sarzani R (2008) Endocannabinoids, blood pressure and the human heart. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1:58-62.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122:509-522.
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 22:565-572.
- Schulkin J, Morgan MA, Rosen JB (2005) A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends Neurosci*, 28:629-635.
- Serra G, Fratta W (2007) A possible role for the endocannabinoid system in the neurobiology of depression. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*, 19:3-25.
- Serrats J, Mengod G, Cortés R (2005) Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat*, 29:83-91.
- Sharp T, Boothman L, Raley J, Quéré P (2007) Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci*, 28:629-636.
- Sillaber I, Holsboer F (2004) Animal models of mood disorders. En: Charney DS, Nestler EJ, eds. *Neurobiology of Mental Illness*. New York: Oxford University Press, pp. 380-396.
- Simon AB, Gorman JM (2006) Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. *NeuroRx*, 3:57-68.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 15:1768-1777.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008) The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*, 154:369-383.
- Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP (2008) The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139:225-236.

-
- Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, Bächli H, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008a) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J*, 8:196-208.
 - Steiner MA, Marsicano G, Wotjak CT, Lutz B (2008b) Conditional cannabinoid receptor type 1 mutants reveal neuron subpopulation-specific effects on behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology*, (En prensa)
 - Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388:773-778.
 - Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85:367-370.
 - Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215:89-97.
 - Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 64:193-198.
 - Szabo B, Schlicker E (2005) Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*, 168:327-365.
 - Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276:2048-2050.
 - Toth E, Sershen H, Hashim A, Vizi ES, Lajtha A (1992) Effect of nicotine on extracellular levels of neurotransmitters assessed by microdialysis in various brain regions: role of glutamic acid. *Neurochem Res*, 17:265-271.
 - Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, 53:865-871.
 - Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83:393-411.
 - Tzavara ET, Monory K, Hanoune J, Nomikos GG (2002) Nicotine withdrawal syndrome: behavioural distress and selective up-regulation of the cyclic AMP pathway in the amygdala. *Eur J Neurosci*, 16:149-153.
 - Tzavara ET, Davis RJ, Perry KW, Li X, Salhoff C, Bymaster FP, Witkin JM, Nomikos GG (2003) The CB₁ receptor antagonist SR141716A selectively

- increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol*, 138:544-553.
- Urigüen L, Pérez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB₁ receptors. *Neuropharmacology*, 46:966-973.
 - Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS (1997) 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*, 17:2785-2795.
 - Vaidya VA, Terwilliger RM, Duman RS (1999) Role of 5-HT_{2A} receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 262:1-4.
 - Valentino RJ, Bey V, Pernar L, Commons KG (2003) Substance P acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity. *J Neurosci*, 23:7155-7159.
 - Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R (2002). Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br J Pharmacol*, 135:564-578.
 - Valverde O (2005) Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behaviour. *Curr Pharm Des*, 11:3421-3429.
 - van der Stelt M, Di Marzo V (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7:37-50.
 - Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di MV, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science*, 310:329-332.
 - Velasco G, Carracedo A, Blázquez C, Lorente M, Aguado T, Haro A, Sánchez C, Galve-Roperh I, Guzmán M (2007) Cannabinoids and gliomas. *Mol Neurobiol*, 36:60-67.
 - Vinod KY, Hungund BL (2006) Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends Pharmacol Sci*, 27:539-545.
 - Viveros MP, Marco EM, File SE (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav*, 81:331-342.
 - Viveros MP, Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M (2007) Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast*, 2007:52908.
 - Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*, 22:6810-6818.

-
- Wade MR, Degroot A, Nomikos GG (2006) Cannabinoid CB₁ receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. *Eur J Pharmacol*, 551:162-167.
 - Wallace TL, Stellitano KE, Neve RL, Duman RS (2004) Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. *Biol Psychiatry*, 56:151-160.
 - Walsh BT, Seidman SN, Sysko R, Gould M (2002) Placebo response in studies of major depression: variable, substantial, and growing. *JAMA*, 287:1840-1847.
 - Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*, 23:1398-1405.
 - Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16:239-249.
 - Watkins SS, Stinus L, Koob GF, Markou A (2000) Reward and somatic changes during precipitated nicotine withdrawal in rats: centrally and peripherally mediated effects. *J Pharmacol Exp Ther*, 292:1053-1064.
 - Wenger T, Moldrich G (2002) The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66:301-307
 - Wiegert O, Joëls M, Krugers H (2006) Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus. *Learn Mem*, 13:110-113.
 - Williamson EM, Evans FJ (2000) Cannabinoids in clinical practice. *Drugs*, 60:1303-1314.
 - Willner P, Mitchell PJ (2002) The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*, 13:169-188.
 - Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52:90-110.
 - Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296:678-682.
 - Witkin JM, Tzavara ET, Davis RJ, Li X, Nomikos GG (2005) A therapeutic role for cannabinoid CB₁ receptor antagonists in major depressive disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 26:609-617.
 - Wonnacott S, Barik J, Dickinson J, Jones IW (2006) Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters. *J Mol Neurosci*, 30:137-140.

- World Health Organization (2002) The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life; Geneve, Switzerland.
- Zoumakis E, Rice KC, Gold PW, Chrousos GP (2006) Potential uses of corticotropin-releasing hormone antagonists. *Ann N Y Acad Sci*, 1083:239-251.

ANEXO

Balerio GN, Aso E, Maldonado R.

Involvement of the opioid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice.

Psychopharmacology (Berl). 2005 Sep;181(2):260-9. Epub 2005 Oct 14.

Artículo enviado a *Proc Natl Acad Sci U S A* (segunda revisión)

Abnormal embryonic development, craniofacial morphogenesis and behavior in mice deficient for the N-terminal region of GTF2I

Jaume Lucena^{1,2}, Susana Pezzi^{1,2}, Ester Aso³, María del Carmen Valero⁴, Candelas Carreiro⁵, Pierre Dubus⁶, Adriana Sampaio⁷, Isabel Barthelemy⁸, Nuno Sousa⁷, José L. Barbero⁹, Rafael Maldonado³, Luis A. Pérez-Jurado^{1,2,10,*}, and Victoria Campuzano^{1,2}

¹ Genetics Unit, ² Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), and ³ Laboratory of Neuropharmacology, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain

⁴ Beckman Institute, University of Illinois at Urbana Champaign, Urbana, IL 61801, USA

⁵ Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, 28029 Madrid, Spain

⁶ EA2406, Histologie et Pathologie Moléculaire, University of Bordeaux 2, Bordeaux, France

⁷ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal

⁸ Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28029 Madrid, Spain

⁹ Department of Cell Biology and Development, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain

¹⁰ Program in Molecular Medicine and Genetics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain

* Corresponding author: Luis A. Pérez Jurado. Genetics Unit, Universitat Pompeu Fabra.
Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Dr. Aiguader 88. 08003 Barcelona, Spain.
Tel: +34 93 316 0856; Fax: +34 93 316 0901. E-mail: luis.perez@upf.edu

ABSTRACT

GTF2I is a general intrinsic transcription factor and calcium channel regulator with high and ubiquitous expression, and a strong candidate for involvement in the morphological and neurodevelopmental anomalies of the Williams-Beuren syndrome (WBS). We have generated mice with a targeted disruption of *Gtf2i* leading to a deletion of its N-terminal part. Heterozygous mice exhibit some of the main phenotypic features of WBS, including craniofacial anomalies, some neurobehavioral alterations and hyperacusis or odyacusis. Homozygous mutants have reduced embryonic viability and more severe craniofacial alterations but no neurobehavioral phenotype. Our data indicate that, although additive effects of haploinsufficiency at several genes may contribute to the full craniofacial or neurocognitive features of WBS, *GTF2I* is one of the main players. In addition, these findings show that the N-terminus of GTF2I is essential for the formation of higher-order protein complexes, thus playing an important role in the final function of GTF2I transcription factors in development and neurocognition.

INTRODUCTION

The general transcription factor II-I (GTF2I or TFII-I) is a ubiquitously expressed helix-loop-helix protein involved in the transcriptional regulation of genes containing initiator sequences (Inr), which are estimated to exist on 85% of all the human genes (1, 2). GTF2I can act as activator or repressor of transcription, depending on the interacting proteins and the sequence context of the promoter region (3-5). In humans, four isoforms of GTF2I produced by alternative splicing have been described (Δ , α , β , and γ) (2, 6). These isoforms are differentially expressed in various cell types and show equivalent transactivating activities *in vitro*. However, they form stable homomeric and heteromeric complexes with variable activity; thus, complex formation is thought to play an important role in regulating the global GTF2I function (7, 8). All isoforms contain a leucine zipper sequence at the N-terminal region, six direct I-repeats, two nuclear localization signals, a DNA-binding domain, a split PH domain, and a C-terminal activation domain (9, 10). The transcriptional activity of GTF2I is dependent on its tyrosine phosphorylation at defined residues, a process that is required for its translocation to the nucleus. A variety of growth-promoting and mitogenic stimuli can enhance tyrosine phosphorylation of GTF2I with the subsequent activation of its target promoters (11-15). Additionally, there are several consensus Src-phosphorylation sites that may play critical roles in signal transduction and transcription (2). The N-terminal domain of GTF2I, including the first 90 amino acids, has been shown to be important for both, the formation of oligomers and its interaction with Btk (16). Interestingly, a relevant additional function outside the nucleus also dependent on tyrosine phosphorylation has recently been described for GTF2I. GTF2I is an inhibitor of agonist-induced calcium cellular entry by competing with TRPC3, a cell surface Ca^{2+} channel, for binding to phospholipase C (9).

In humans, the *GTF2I* gene is located on chromosome 7q11.23, in an interval that is invariably deleted in patients with Williams-Beuren syndrome (WBS), a rare neurodevelopmental disorder (6, 17). Individuals with WBS manifest characteristic dysmorphic features including a narrow forehead, midface hypoplasia, a short upturned nose with broad nasal tip, alongside with other developmental abnormalities such as cardiovascular problems, mild to moderate mental retardation and growth retardation (18). The behavioral and cognitive profile of WBS individuals is characterized by relatively proficient language and face-processing skills, but serious impairments in visuo-spatial and numerical abilities. Personality traits include overfriendliness and charismatic speech. Hyperacusis or algiacusis is also an almost constant feature. The roots of the mental and cognitive aspects probably lie in disruption of normal neurodevelopment, because brain morphology and neural organization are abnormal (19).

A firm pathogenic mechanism has been established for the cardiovascular problems that are known to be caused by haploinsufficiency for the elastin gene (20). Additional candidates for involvement in several aspects of the WBS phenotype have been proposed on the basis of clinical-molecular correlations in a few patients with partial phenotypes and smaller deletions. Two members of the *GTF2I* gene family, *GTF2I* and *GTF2IRD1*, highly expressed during development and in normal neuronal tissues (21), are strong candidates for the craniofacial and some neurobehavioral features of WBS (22-24). Targeted disruption of single genes in mouse models has provided additional evidence for the involvement of *Gtf2ird1* in the craniofacial and cognitive phenotype, as well as *Cyln2* in the neurocognitive features (25-27). However, despite all these advances, the specific contribution of these genes to the phenotype and the underlying pathogenic mechanisms of the disease are not yet fully understood.

A great deal of information about the functions of GTF2I has been obtained recently, mostly from *in vitro* studies of over-expression, protein interaction and transcription regulation (2-5, 7-16, 22). Here, we have studied the *in vivo* effects of a deletion of the N-terminal part of GTF2I. The phenotypic characterization of this mouse model reveals that the deficiency of GTF2I can contribute to important features displayed by WBS patients such as the craniofacial abnormalities and some neurobehavioral alterations including hyperacusis. The analysis of the expression of endogenous genes in hippocampus of this model also provides information about the pathways regulated by this transcription factor that may be altered in WBS.

RESULTS

TARGETING OF THE MOUSE *Gtf2i* GENE

A portion of the *Gtf2i* gene containing the translation start site was isolated as described (see Methods) to generate a targeting vector (Figure 1A). The construct contained a Neomycin resistance element which replaced exon 2 of the mouse *Gtf2i* gene. Targeted R1 ES cell clones were screened by Southern blot and PCR analysis. Almost 4% of the clones carried the correct mutation. Positive clones were aggregated with CD1 morulae to generate chimeras. Germline transmission was achieved by crossing chimeric males with CD1 females. Correct mutation transmission was screened by Southern blot analysis (Figure 1B).

To confirm changes in *Gtf2i* expression, RNA and protein were extracted from various tissues of wild-type (*Gtf2i*^{+/+}), heterozygous (*Gtf2i*^{+/ Δ ex2}) and homozygous (*Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2}) mice. RT-PCR analysis with primers located in the first and fourth exons revealed the presence of an alternative shorter transcript in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} and *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice compared to wild-type mice (Figure 1C). Sequence analysis confirmed the absence of exon 2 in the shorter transcript. Western blot analysis revealed that this transcript was translated in a shorter form of GTF2I (Figure 1D). Interestingly, enhanced expression of the shorter protein with respect to the wild type was observed in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} MEFs, but not in other fetal and adult tissues of *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} mice (not shown). Since this truncated form was also recognized by the anti-GTF2I antibody, we hypothesized that the deletion of entire exon 2 containing the initiation codon abrogated to the use of a second in frame start codon downstream in the mutant mRNA. *In silico* analysis (Netstart program) identified the first putative in frame translation start site with suitable Kozak consensus sequence located in exon 5, predicting a protein lacking the first 140aa (Δ 140GTF2I). We generated an expression vector with a *Gtf2i* cDNA coding for such a

truncated $\Delta 140$ GTF2I (exons 5-35), and expressed it in COS7 cells. Figure 1D shows that the observed endogenous truncated form in the $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ and $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ mice co-migrated with the artificial truncated protein, suggesting that our predictions were right and the ATG identified at exon 5 was indeed used as the start codon for translation in the targeted gene.

GROWTH PROPERTIES OF MUTANT MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS

Next, we decided to test whether GTF2I may provide a direct link between mitogen-dependent signaling and changes in nuclear gene expression that govern cellular proliferation and cell division.

Eleven independent cultures derived from six different embryos were grown following the classical 3T3 protocol to obtain fully immortalized clones (28). As illustrated in Figure 2A, $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ mouse embryonic fibroblast (MEF) cultures immortalized around eight passages earlier than $Gtf2i^{+/+}$ and $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ cultures. The number of passages until immortalization was independent of the altered pathway (blockage of 53/p21 or loss of p16), as tested by immunoblot (not shown).

$Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ MEF cultures did not grow at high density. Indeed, the number of $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ cells in saturated cultures was $1,9 \pm 1,5 \times 10^6$ per 10 cm dish ($n = 3$), whereas wild-types and $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ MEFs reached saturation levels that were two times higher ($3,8 \pm 6,5$ and $4,1 \pm 0,15 \times 10^6$ per 10 cm dish, $n = 3$, respectively) (Figure 2B). $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ MEF cultures also proliferated less efficiently than controls' (Figure 2C) and had reduced plating efficiency opposite to the properties shown by $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ cultures. Whereas plating 4000 $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ MEFs in a Petri dish yielded only $21 \pm 3,5$ colonies, the same amount of $Gtf2i^{+/+}$ or $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ MEFs led to $114 \pm 7,1$ and $142 \pm 4,2$ colonies,

respectively. Finally, quiescent *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} MEFs re-entered the cell cycle with normal kinetics upon serum stimulation (Figure 2D). However, the proportion of cells that entered to the S phase was reduced by about 70% when compared with *Gtf2i*^{+/+} or *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} MEFs.

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE Δ 140GTF2I PROTEIN

The generated Δ 140GTF2I protein lacks the leucine zipper motif that is present in the N-terminal end of all the endogenous GTF2I isoforms of human and mouse (6, 29). *In vitro* studies have shown that the deletion of the N-terminal 90 amino acids of a GTF2I- Δ isoform affects its DNA binding ability leading to a fail to activate transcription on GTF2I-dependent reporters in transient transfection assays. This mutant protein also failed to interact with the wild-type GTF2I- Δ isoform suggesting that the N-terminal region might control the extent of complex formation and consequently, the nuclear function of GTF2I (10). Consequently, we decided to examine whether the expression of the Δ 140GTF2I could also alter the normal balance or/and distribution of the endogenous isoforms in modified mice, potentially affecting the formation of complexes and/or its nuclear function. First, we tested by RT-PCR the presence of mRNA coding for different protein isoforms generated by alternative splicing of several exons. We identified, cloned and sequenced, six isoforms resulting from alternative splicing of exons 10 through 12, and named them in agreement with the human counterparts (Figure 3A). We then performed a relative quantification of the expression of the mRNA from each isoform, using three mice per genotype and four different tissues (kidney, spleen, ovary and cerebral cortex). Independently of the tissue examined, the three variants expressed at higher levels were always those coding for the β , Δ , and ω isoforms. A switch in the relative abundance of the ω and γ isoform mRNA

was only observed in the cerebral cortex. The α and ε isoform mRNAs were detected although at very low levels in all tissues. Interestingly, we observed that the pattern of expression showed significant changes among genotypes ($P=0.0003$) (Figure 3A, right). Most notably, the GTF2I- Δ isoform mRNA became the most highly expressed in $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ mice ($45,8 \pm 4,1$ for GTF2I- Δ vs. $36,8 \pm 8,2$ for GTF2I- β) while the β -isoform mRNA was the most abundant in $Gtf2i^{+/+}$ ($47,3 \pm 2,7$ for GTF2I- β vs. $40,4 \pm 2,5$ for GTF2I- Δ) and $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ mice ($54,5 \pm 2,9$ vs. $37,1 \pm 2$ for Δ -isoform). The mechanisms leading to the variable distribution of isoform transcripts in heterozygous mice remain unclear.

By immunocytochemistry, we detected that the mutant $\Delta 140$ GTF2I was localized preferentially in the nucleus of primary MEFs (Figure 3B) a behavior similar to the wild type protein and also the GTF2I variant with N-terminal deletion of 90 amino acids (10). Our findings indicate that the N-terminus is not required for nuclear translocation and that the variable distribution of GTF2I isoforms does not play a major role in directing the nuclear localization of the protein or protein complexes.

Finally, we attempted to test the transcriptional properties of the $\Delta 140$ GTF2I compared with the wild type GTF2I protein by quantifying the endogenous mRNA levels from several genes (*Cyclin D1*, *c-fos*, *Luciferase*, *Gapdh*, *Hsp70*, β -actin and *Gtf2i*) in arrested or serum stimulated MEFs. We also analyzed the transcriptional response of COS7 cells transfected with the $\Delta 140$ GTF2I- β construct, using murine GTF2I- β and human GTF2I- Δ constructs as controls. Among the genes examined *c-fos* and *Cyclin D1* contain canonical Inr elements on the promoter region close to the transcription start sites and have been previously reported as substrates for GTF2I (2, 8, 30). However, we could not appreciate any significant expression changes between genotypes in MEFs nor in COS7 transfected with $\Delta 140$ GTF2I- β or GTF2I- β

(Supplemental Figure 1), indicating a lack of significant effect of $\Delta 140\text{GTF2I-}\beta$ or $\text{GTF2I-}\beta$ in the reported genes in the cellular models used.

***Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} MICE HAVE REDUCED VIABILITY AND ABNORMAL CRANIOFACIAL MORPHOLOGY**

Mice heterozygous and homozygous for the *Gtf2i* mutation appeared to be grossly normal, fertile and indistinguishable from their wild-type littermates. By contrast, abnormal Mendelian frequencies of the expected genotypes in different crosses were found at birth, with a clear reduction of *Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} animals (Table 1). To investigate the role of *Gtf2i* in mouse development, we first analyzed the genotype frequencies of embryos at 9.5-12.5 dpc. *Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} embryos were already underrepresented from the expected Mendelian ratio at 9.5 dpc (Table 1), suggesting a much higher rate of early lethality of *Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} mice.

Histological examination of decidual swellings at E6.5-8 dpc resulting from *Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} x *Gtf2i* ^{$+/ \Delta\text{ex2}$} matings revealed a significant percentage of highly disorganized embryos with gross morphological alterations [Normal/Abnormal = 58(72,5%)/22(27,5%)]. Only structures related to the ectoplacental cone and trophoblast giant cells could be morphologically identified (Figure 4A). Loss of the epiblast in defective embryos appeared to be a consequence of decreased cell proliferation, as determined by a marked reduction of Ki67 immunostaining. No increased apoptosis was revealed by TUNEL staining despite that a significant number of *Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} animals were lost before E7.5 dpc (Figure 4A).

On physical exam, gross anatomy of mutant mice appeared to be normal, with normal body size and weight. However, a more detailed evaluation revealed an obvious craniofacial phenotype in *Gtf2i* ^{$\Delta\text{ex2}/\Delta\text{ex2}$} mice, more subtle in *Gtf2i* ^{$+/ \Delta\text{ex2}$} animals,

consisting in a shorter nose and wider nasal bridge as shown in Figure 4B. Specific measurements of cranial morphology (distance from the occipital suture to the tip of the nasal bone) revealed significant differences between the genotypes ($P=0.004$) (Figure 4B). These features are quite similar to the craniofacial anomalies also present in the *Gtf2ird1* KO mice (25), even though, in contrast to *Gtf2i* mutants, *Gtf2ird1* KO showed phenotype only in the homozygous state. The craniofacial anomalies did not affect the brain morphology which appeared anatomically normal. Because the WBS phenotype suggests prominent functional alterations in the hippocampal function (declarative memory and spatial navigational information) (19), we searched for putative developmental neuroanatomical defects by stereological analysis of volumes and total neural numbers. We analyzed global brain and three areas of the hippocampus (CA1, CA3 and the dentate gyrus) in three adult male animals per genotype. No significant abnormalities were observed in the mutant animals with respect to the controls, even though a trend for a reduction of total volumes in male heterozygous could be appreciated (data not shown).

BEHAVIORAL ALTERATIONS IN ADULT *Gtf2i* MUTANT MICE

To evaluate a possible involvement of GTF2I in the psychomotor and neurobehavioral WBS phenotype, *Gtf2i*^{+/+}, *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} and *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice (n = 10 per group) were evaluated in several paradigms.

Motor coordination (wire hanging test), locomotor activity (actimetry boxes) and anxiety-related behaviors (lit-dark box; elevated plus maze; open field) were first explored. A significant decrease in the vertical activity (Figure 5A) as well as high levels of anxiety in the lit/dark box (increased latency of the first entry and decreased number of entries and percentage of time in the lit compartment) (Figure 5B) and in the

elevated plus maze (decreased percentage of entries in the open arms) (Figure 5C) was evident in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} mice. No significant changes on horizontal locomotor activity were revealed among genotypes. The spontaneous mechanical (tail pressure test) and the thermal nociceptive (tail immersion and hot plate tests) thresholds were also evaluated but no significant differences were found among genotypes (Supplemental Figure 2).

The active avoidance paradigm was used to examine cognitive responses in these animals. As illustrated in Figure 5D, *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice improved the performance in the test, revealed by the significant increase in the conditioned changes ratio respect to *Gtf2i*^{+/+} and *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} mice. Sound intolerance was also measured by evaluating the time of freezing behavior at different sound intensities. *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} mice showed a significantly lower threshold for sound intolerance, suggestive of the presence of algiacosis and/or hyperacusis already at 65 dB (Figure 5E).

Finally, we measured the social behavior by mean of the resident-intruder test. No significant difference in the pattern of aggressiveness and social behavior was observed among the different groups of mice (Supplemental Figure 2).

In summary, a significant phenotype was obvious in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} animals with decreased exploratory activity, higher anxiety and a lower threshold for sound intolerance, while *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} performed in the same range as *Gtf2i*^{+/+} controls in most paradigms except for an improved learning in the active avoidance test.

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES

In order to identify candidate genes and pathways that could be responsible of the observed neurocognitive phenotype, we performed a comparative transcriptomic analysis at the hippocampus. Pools of mRNA derived from five previously phenotyped mice corresponding to each genotype were subjected to microarray analysis. We

decided to compare pools instead of single individuals in order to minimize individual and technically-related variation. Using stringent criteria to define up- and down-regulation, a total of 102 genes were identified as deregulated (Supplemental Table 1). A greater number of modified genes with respect to wild-type animals was observed in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} animals (n=65) compared to *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice (n=24), and a greater proportion corresponded to down-regulated genes in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} animals, somehow consistent with the phenotypic data. Only a few genes were deregulated in the same direction in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} and *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice (9 down-regulated and 4 up-regulated). To validate the microarray results, we carried out real-time RT-PCR analysis in a sub-set of selected genes (~15%) using the same RNA samples as templates. The RT-PCR results directly reflected the changes seen by microarray for nearby all the genes examined (14/15).

Classifying the modulated genes by biological processes, 61% were implicated in metabolism (29% nucleic acid, 25% protein), 28% in signal transduction and 7% in response to stimuli related with behavior. Concerning the predicted molecular function, 93% were related with binding process (30% protein-binding, 20% ion-binding, 17% nucleotide-binding and 15% nucleic acid-binding). Interestingly, two of the genes with significantly reduced expression only in *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} animals encode proteins with relevant functions in hippocampal neurons: *Synpo* (1,66 fold reduction) is involved in synaptic plasticity, and *Birc1f* (2,07 fold reduction) in preventing apoptosis (31, 32).

Therefore, we have identified many potential direct or indirect targets for GTF2I function. In agreement with the functional and expression analyses performed in the cellular models and referred above, neither *c-fos* nor *Cyclin D1* appeared deregulated in the adult hippocampus by microarray analysis.

DISCUSSION

In an attempt to create mouse models for WBS, we have generated a knockout mouse with a deletion of exon 2 of *Gtf2i* resulting in the expression of a short GTF2I protein lacking the initial 140 amino acids. A remarkable neurobehavioral phenotype was evident in heterozygous mutant animals consisting in decreased exploratory activity despite normal motor coordination, enhanced anxiety and a low threshold for sound intolerance. Homozygous mutants showed a reduced viability early in development, with death before E8.5. However, the small proportion of surviving *Gtf2i*^{Δex2/Δex2} mice, only 3-13%, developed normally to adulthood with normal pre and postnatal growth and performed in the same range as wild-type controls in most neurobehavioral paradigms. Our findings indicate that GTF2I activity is essential for cell proliferation during early embryogenesis and that such requirement can be only partially compensated in a small percentage of cases, possibly by other GTF2I family members. However, GTF2I seems not necessary for late fetal and postnatal development although its deficiency leads to specific neurological features. In an apparent paradox, the neurological phenotype was evident only in *Gtf2i*^{+/Δex2} heterozygous animals and absent in *Gtf2i*^{Δex2/Δex2} homozygous mutants. Possible explanations for this paradox include the existence of adaptation or compensatory tissue specific mechanisms in *Gtf2i*^{Δex2/Δex2} homozygous mice after embryonic survival, and the putative different molecular consequences of hetero and homozygosity for the mutant Δ140GTF2I protein, as discussed in the next paragraph.

GTF2I is an intrinsic transcription factor, with important biological functions through its role in activating/repressing the transcription of a number of genes (2, 3, 33-35). In humans, the four alternatively spliced isoforms of GTF2I show homomeric and heteromeric interactions, and the oligomer formation strongly correlates with DNA-binding activity (7, 8). The leucine zipper motif located in the N-terminal part of GTF2I

is thought to be required for controlling the extent of complex formation and consequently its nuclear function (8). Our results underscore the *in vivo* relevance of the N-terminal part of GTF2I in appropriate stoichiometric concentrations. Heterozygous $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ MEFs proliferated well, but their growth rates were significantly slower and failed to grow dense cultures when compared to wild-type and homozygous $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ cells. Moreover, quiescent $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ MEFs did not re-enter the cell cycle upon mitogenic stimuli as efficiently as their normal counterparts, suggesting a signaling defect mediated by the GTF2I-containing higher-order protein complexes. Therefore, we propose that the presence of the $\Delta 140$ GTF2I protein leads to an abnormal composition of the GTF2I complexes with different consequences in the heterozygous or homozygous state, consistent with the paradoxically different phenotypic manifestations of $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ and $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ mice. Given the inducible properties and multiple functions of GTF2I from early in development into adulthood (21, 29, 36), it is also logical to find variable consequences of $\Delta 140$ GTF2I hetero- and homozygosity at different developmental times and tissues. In agreement with this hypothesis, transcriptomic analysis on the hippocampus showed a higher number of modified genes, mainly down-regulated, in heterozygous $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ mice compared to wild-type and homozygous $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ animals. In addition, significant changes in expression of the mRNAs encoding the different GTF2I isoforms were observed among genotypes. Surprisingly, however, *in vitro* assays did not reveal any expression changes of the examined *c-fos* and *Cyclin D1* genes in COS7 cells transfected with a cDNA coding for the $\Delta 140$ GTF2I protein. Consistently, the transcription of those genes was also unaffected in the expression assays with microarrays from hippocampus, suggesting that they are not among the main targets for GTF2I regulation.

Based on clinical-molecular correlations in patients with partial deletions of the WBS region, two members of the *GTF2I* gene family, *GTF2I* and *GTF2IRD1*, have been proposed as strong candidates for the craniofacial and some neurological features of WBS, while *CYLN2* is thought to contribute to the neurological and cognitive phenotype (22-24). In addition, already available mouse models support these hypotheses. *Cyln2^{-/-}* and *Cyln2^{+/-}* mice present with mild structural brain abnormalities, hippocampal dysfunction, and deficits in motor coordination, as well as mild growth deficiency but no craniofacial defects (37). A transgenic mouse in which the integration of the *c-myc* transgene caused a deletion of the first exon of *Gtf2ird1* showed some craniofacial abnormalities reminiscent of those seen in WBS, together with growth retardation and possible neurological dysfunction (25). Another *Gtf2ird1*-targeted mouse showed reduced aggression and natural fear response and increased social interaction combined with impaired amygdala-based learning (26). However, haploinsufficiency for *CYLN2*, *GTF2IRD1* and *ELN* alone or in combination cannot explain all the clinical features of WBS (37). The more pronounced craniofacial, neurocognitive and behavioral phenotypes associated with the common deletion implicate other telomeric genes in these features, most likely *GTF2I*, deleted in all classic WBS cases and some patients with partial deletions and a rather complete phenotype (17, 18, 23-25).

In agreement with these observations, we show here that the deficiency of *GTF2I* by ablation of the first 140 amino acids in mice results in a characteristic phenotype related to the WBS phenotype. In addition to the mentioned neurological features, *Gtf2i^{+/ Δ ex2}* and *Gtf2i ^{Δ ex2/ Δ ex2}* mice display craniofacial abnormalities, with a shorter but symmetric snout and apparent midface hypoplasia. Given that loss of *Gtf2ird1* leads to a similar, although asymmetric, craniofacial phenotype in mice, and

that GTF2I and GTF2IRD1 share functional domains and expression patterns and are known to interact to each other, haploinsufficiency at both loci is likely to result in additive or synergistic effects.

Another interesting feature of *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} animals is the auditory phenotype, also reminiscent of that seen in WBS. Most WBS individuals show odynacusis, a lowered pain threshold for loud sound, along with auditory allodynia, the specific aversion to certain sounds; true hyperacusis, meaning a lowered hearing threshold, and auditory fascinations are also present although only in 5-10% of cases (38). The origin of these highly penetrant auditory symptoms in WBS is not yet understood. The normal speech discrimination and the lack of abnormal loudness growth function in electrophysiological studies suggested abnormalities in central auditory processing (39). *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} animals showed clear odynacusis, manifested by a lowered pain threshold for loud sound (evident at 65dB), thus indicating that deletion of GTF2I is likely responsible for the similar auditory phenotype in WBS.

The observed phenotype in these mice is consistent with the expression pattern of *Gtf2i* during development and in the adult brain, including the hippocampus (21). The results of the transcriptomic analysis have shown that GTF2I participates directly or indirectly in regulating the expression of *Synpo* and *Birc1f*, among other genes related with hippocampal neurons. The BIRC proteins, also known as family of IAP proteins, are antiapoptotic both *in vitro* and *in vivo* (40) and have been found upregulated to prevent neurocognitive deficit following cranial irradiation (31). *Synpo*-null mice are viable and fertile but present learning impairments due to deficits in synaptic plasticity in the hippocampus (32). Therefore, GTF2I might contribute to the hippocampal dysfunction in WBS and *Gtf2i* mutant mice at least in part by leading to insufficient expression of the *Synpo* and/or *Birc1f* genes.

In summary, our observations in the *Gtf2i*^{Δex2} mouse models illustrate that *GTF2I* associates with some of the main phenotypic features of WBS, including the craniofacial abnormalities, some neurobehavioral alterations and the hyper or odyneacusis. As shown by previous studies in human and mouse, no single gene appears to be responsible for all the craniofacial or neurocognitive features of WBS (18, 21-27, 37, 41). Instead, the additive effect of haploinsufficiency at several genes appears to be required, and we propose that *GTF2I* is one of the main players. In addition, our data strongly suggest that the N-terminus of GTF2I is essential for oligomerization and formation of higher-order protein complexes, thus playing an important role in the final functions of GTF2I in development and neurocognition.

Methods

Generation and genotyping of *Gtf2i* mutant mice

Mouse *Gtf2i* cDNAs and genomic sequences were cloned by plate hybridization from a mouse testis cDNA library and a lambda genomic library, respectively. For excision of the second exon of *Gtf2i*, which contains the initiation start codon, we subcloned upstream and downstream genomic fragments in a plasmid containing the *PGK-neo* cassette (Figure 1A). The resulting targeting vector, p856, was linearized and electroporated into mouse R1 ES cells, and recombinant clones were selected in the presence of G418. Seven G418^R clones were identified by Southern hybridization using probes external to the targeting vector and PCR strategies. Recombinant clones were used to generate chimeric mice by aggregation to CD1 morulae. *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} mice were intercrossed to generate mouse colonies in the 129Sv \times CD1 background or backcrossed to generate a pure C57BL/6J colony. The experiments described in this manuscript were carried out with animals in the 129Sv \times CD1 background.

Genotyping of *Gtf2i* mutant mice was carried out by PCR amplification. To identify wild-type allele (377 bp) we used primers m*Gtf2i*-I1F (forward) and m*Gtf2i*-I1R (reverse). To identify the mutant (Δ ex2) allele (309 bp) we added a second reverse primer m*Gtf2i*-neo to the amplification reaction. Primer sequences are included in the SI Table 3. The annealing temperature was 60°C and they were amplified for 30 cycles.

Animals were maintained under standard animal housing conditions in a 12-h dark-light cycle with free access to food and water. Animal care was in accordance with ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Local Ethical Committee (IMAS-IMIM/UPF).

Cell Culture and Immunocytofluorescence

We obtained and characterized MEFs following the previously described protocols (42). All the experiments were made by triplicate. Spontaneous immortalization was carried out following a classical 3T3 protocol (28). All cultures (MEFs and COS7) were maintained in DMEN supplemented with 10% CS at 37°C in a 5% CO₂ environment.

To detect endogenous GTF2I, immunocytofluorescence was performed in primary MEFs. The cells were cultured on sterile glass cover slips and after fixation and permeabilization were stained with the anti-GTF2I rabbit polyclonal antibodies (gift of A. Roy) in 1:200 dilution. Nuclear DNA was additionally stained with Hoechst 33258 (Molecular Probes). Microphotographs were taken using an Olympus BXS1 microscope with an epifluorescence and phase-contrast optics equipped with the Olympus DP71 camera and using the software Cell^B Digital Imaging system. A more detailed description of these methods could be found in Supplemental Methods.

mRNA expression analyses

Total RNA from cells and tissue samples of mice was isolated using the TRIZOL reagent (Invitrogen). For RT-PCR amplification, cDNA was prepared from 1 µg total RNA using random hexamers and SuperScript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNA solution was subjected to 25-30 cycles of PCR amplification by using specific primers (SI Table 3). Absence of genomic DNA contamination was determined by the non-amplification of a small genomic fragment using genomic DNA as positive control. RT-PCR products were subject to electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized. Relative quantification of ethidium bromide stained samples was obtained using the software Quantity One (Version 4.3.1 Biorad).

In order to distinguish and quantify the different splicing variants, flanking primers located on exons 9 (forward) and 13 (reverse) of the *Gtf2i* gene were used, and the reverse oligonucleotide was labelled with 5-FAM dye. RT-PCR products were analyzed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). Estimation of percentage of each isoform was performed by comparing the relative ratios of the areas under the peaks corresponding to each variant using the Genemapper v3.7 software (PE Applied Biosystems). Three different samples per tissue were analyzed and each assay was performed by triplicate.

For microarray analysis, total RNA from the hippocampus was isolated as recommended (RNeasy, Qiagen). RNA quality was assessed with the Model 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Two-color microarray hybridizations were performed using the GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) and confronting of the three genotypes. All the hybridizations were done in duplicate with direct and dye swap experiments. Fluorescent images were obtained with the Agilent G2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies), and TIFF images were quantified with the use of the Spot program (<http://experimental.act.cmis.esiro.au/Spot/index.php>) under the R environment (<http://www.r-project.org>). The resulting raw values were filtered and an intensity cut-off was applied, selecting those points with a foreground median/background median >3 in at least one channel.

Real-Time PCR was performed using the SYBR Green Ready Master Mix according to the manufacturer's instructions in an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The standard curve method was used for the analysis. The results were normalized respect to two housekeeping genes, *Gus B* and

Tubb4. A reagent-only (no DNA) negative control sample was included in each run. Experiments were carried out in triplicate to ensure reliability.

Protein analysis

Plasmids expressing mouse GTF2I wild type and Δ 140GTF2I (both β -isoform) were generated using a PCR-based strategy (TFIIWT and TFIIN140 as forward primers and a common reverse primer TFIIR (SI Table 3)). PCR products were gel-purified, ligated into the pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen). The correct amplification of cloned products was tested by sequencing.

Transient transfection was carried out in COS-7 cells using Fugene reagent (Roche). After 48h, recombinant proteins were isolated. Equal amounts of protein extracts (20 μ g/lane) were separated by SDS-PAGE according to the protocol described by Laemmi (43). Equal loading and transfer of samples were confirmed by staining the membranes with Ponceau S. After blocking with 3% BSA membranes were incubated with the specific primary antibodies: anti-GTF2I (generous gift of Ananda Roy); p16^{INK4a}; p21^{Cip1}; p53 (Neo Markers), α -tubulin (Ab-1; Oncogene Research). After incubation with the corresponding secondary antibodies ECL-plus kit (Amersham Pharmacia) was used to visualize the protein.

Histology and immunohistochemistry

E6.5-7.5 deciduas or adult tissues were surgically removed, fixed in 10% buffered formalin (Sigma), and embedded in paraffin using standard procedures. Sections (6 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). TUNEL assays were performed using the *in situ* cell death detection kit (Roche). Cell proliferation was determined by immunostaining with anti-Ki67 (Dako) according to the manufacturer's

instructions. Brains were split into two hemispheres by a midsagittal section and processed for stereology, according to the procedure described previously (44). More detailed description of stereology analysis can be found in Supplemental Methods.

Behavioral characterization of mice

Mutants and wild-type littermate mice were tested in a battery of “primary screen” behavioral assays in the following order: open field activity, hot plate, lit-dark box, tail immersion and active avoidance. The testing order was predetermined, with less stressful tests conducted before more stressful ones. There was at least 1 day of rest between tests. Additional batches of mice were used for intruder test studies. Each batch of mice consisted of 10 male mice per genotype to ensure sufficient statistical power against variation of behavioral data. More detailed description of behavioral tests can be found in Supplemental Methods.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA with genotype as between subjects’ factor followed by *post hoc* comparisons (Tukey-Scheffé test) to detect statistical differences among levels. The alpha-corrected level for all test was 0,05. All statistic test were made under the R environment (45). Values were expressed as mean±s.e.m.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mireia Vilardell for her help with statistical analysis, Esther Barnadas for excellent technical assistance, and Ananda Roy for generously providing the anti-GTF2I antibody. We are indebted to the Service of Pathology of the Hospital del Mar (Dr. S. Serrano) for making the facilities available to us. This work was supported by

grants from the Spanish Ministry of Health (FIS 04/0433, to VC), the Spanish Ministry of Science and Education (SAF2004-6382 and BFU2006-04406/BMC to LPJ and JLB, respectively), and the VI Framework Programme of the European Union (LSHG-CT-2006-037627, to LPJ). JL was supported by a FPI Fellowship from the Spanish Ministry of Science and Education (SAF2001-3941) and VC is a FIS Investigator.

Author contributions

Conceived and designed the experiments, analyzed the results and wrote the manuscript: VC, LPJ. Performed the experiments: Molecular and cellular biology and histology: JL, SP, VC. Targeting vectors: MCV, LPJ. Mouse generation, maintenance and genotyping: CC, IB, JLB. Behavioral phenotype: EA, JL, RM. Mouse pathology: PD. Stereological analysis of brain and hippocampus: AS, NS.

Bibliography

1. Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Nakamura, Y., et al. 2001. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11:677-684.
2. Roy, A.L. 2001. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* 274:1-13.
3. Ogura, Y., Azuma, M., Tsuboi, Y., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Wada, T., Watanabe, H., and Handa, H. 2006. TFII-I down-regulates a subset of estrogen-responsive genes through its interaction with an initiator element and estrogen receptor alpha. *Genes Cells* 11:373-381.
4. Wen, Y.D., Cress, W.D., Roy, A.L., and Seto, E. 2003. Histone deacetylase 3 binds to and regulates the multifunctional transcription factor TFII-I. *J Biol Chem* 278:1841-1847.
5. McMurray, H.R., and McCance, D.J. 2003. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol* 77:9852-9861.
6. Pérez Jurado, L.A., Wang, Y.K., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J., and Francke, U. 1998. A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet* 7:325-334.
7. Cheriya, V., and Roy, A.L. 2000. Alternatively spliced isoforms of TFII-I. Complex formation, nuclear translocation, and differential gene regulation. *J Biol Chem* 275:26300-26308.

8. Hakre, S., Tussie-Luna, M.I., Ashworth, T., Novina, C.D., Settleman, J., Sharp, P.A., and Roy, A.L. 2006. Opposing functions of TFII-I spliced isoforms in growth factor-induced gene expression. *Mol Cell* 24:301-308.
9. Caraveo, G., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Snyder, S.H., and Desiderio, S. 2006. Action of TFII-I outside the nucleus as an inhibitor of agonist-induced calcium entry. *Science* 314:122-125.
10. Cheriya, V., and Roy, A.L. 2001. Structure-function analysis of TFII-I. Roles of the N-terminal end, basic region, and I-repeats. *J Biol Chem* 276:8377-8383.
11. Cheriya, V., Desgranges, Z.P., and Roy, A.L. 2002. c-Src-dependent transcriptional activation of TFII-I. *J Biol Chem* 277:22798-22805.
12. Novina, C.D., Cheriya, V., and Roy, A.L. 1998. Regulation of TFII-I activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 273:33443-33448.
13. Jiang, W., Sordella, R., Chen, G.C., Hakre, S., Roy, A.L., and Settleman, J. 2005. An FF domain-dependent protein interaction mediates a signaling pathway for growth factor-induced gene expression. *Mol Cell* 17:23-35.
14. Grueneberg, D.A., Henry, R.W., Brauer, A., Novina, C.D., Cheriya, V., Roy, A.L., and Gilman, M. 1997. A multifunctional DNA-binding protein that promotes the formation of serum response factor/homeodomain complexes: identity to TFII-I. *Genes Dev* 11:2482-2493.
15. Kim, D.W., and Cochran, B.H. 2001. JAK2 activates TFII-I and regulates its interaction with extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biol* 21:3387-3397.
16. Sacristan, C., Tussie-Luna, M.I., Logan, S.M., and Roy, A.L. 2004. Mechanism of Bruton's tyrosine kinase-mediated recruitment and regulation of TFII-I. *J Biol Chem* 279:7147-7158.

17. Bayés, M., Magano, L.F., Rivera, N., Flores, R., and Pérez Jurado, L.A. 2003. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 73:131-151.
18. Pérez Jurado, L.A. 2003. Williams-Beuren syndrome: a model of recurrent genomic mutation. *Horm Res* 59 Suppl 1:106-113.
19. Meyer-Lindenberg, A., Mervis, C.B., and Berman, K.F. 2006. Neural mechanisms in Williams syndrome: a unique window to genetic influences on cognition and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 7:380-393.
20. Li, D.Y., Brooke, B., Davis, E.C., Mecham, R.P., Sorensen, L.K., Boak, B.B., Eichwald, E., and Keating, M.T. 1998. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 393:276-280.
21. Danoff, S.K., Taylor, H.E., Blackshaw, S., and Desiderio, S. 2004. TFII-I, a candidate gene for Williams syndrome cognitive profile: parallels between regional expression in mouse brain and human phenotype. *Neuroscience* 123:931-938.
22. Hirota, H., Matsuoka, R., Chen, X.N., Salandanan, L.S., Lincoln, A., Rose, F.E., Sunahara, M., Osawa, M., Bellugi, U., and Korenberg, J.R. 2003. Williams syndrome deficits in visual spatial processing linked to GTF2IRD1 and GTF2I on chromosome 7q11.23. *Genet Med* 5:311-321.
23. Morris, C.A., Mervis, C.B., Hobart, H.H., Gregg, R.G., Bertrand, J., Ensing, G.J., Sommer, A., Moore, C.A., Hopkin, R.J., Spallone, P.A., et al. 2003. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet A* 123:45-59.

24. Edelman, L., Prosnitz, A., Pardo, S., Bhatt, J., Cohen, N., Lauriat, T., Ouchanov, L., Gonzalez, P.J., Manghi, E.R., Bondy, P., et al. 2007. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. *J Med Genet* 44:136-143.
25. Tassabehji, M., Hammond, P., Karmiloff-Smith, A., Thompson, P., Thorgeirsson, S.S., Durkin, M.E., Popescu, N.C., Hutton, T., Metcalfe, K., Rucka, A., et al. 2005. GTF2IRD1 in craniofacial development of humans and mice. *Science* 310:1184-1187.
26. Young, E.J., Lipina, T., Tam, E., Mandel, A., Clapcote, S.J., Bechard, A.R., Chambers, J., Mount, H.T., Fletcher, P.J., Roder, J.C., et al. 2007. Reduced fear and aggression and altered serotonin metabolism in Gtf2ird1-targeted mice. *Genes Brain Behav.*
27. Hoogenraad, C.C., Koekkoek, B., Akhmanova, A., Krugers, II., Dortland, B., Miedema, M., van Alphen, A., Kistler, W.M., Jaegle, M., Koutsourakis, M., et al. 2002. Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat Genet* 32:116-127.
28. Todaro, G.J., and Green, H. 1967. Simian virus 40 transformation and the period of cellular deoxyribonucleic acid synthesis. *J Virol* 1:115-119.
29. Wang, Y.K., Pérez-Jurado, L.A., and Francke, U. 1998. A mouse single-copy gene, Gtf2i, the homolog of human GTF2I, that is duplicated in the Williams-Beuren syndrome deletion region. *Genomics* 48:163-170.
30. Desgranges, Z.P., Ahn, J., Lazebnik, M.B., Ashworth, T., Lee, C., Pestell, R.C., Rosenberg, N., Prives, C., and Roy, A.L. 2005. Inhibition of TFII-I-dependent cell cycle regulation by p53. *Mol Cell Biol* 25:10940-10952.

31. Yazlovitskaya, E.M., Edwards, E., Thotala, D., Fu, A., Osusky, K.L., Whetsell, W.O., Jr., Boone, B., Shinohara, E.T., and Hallahan, D.E. 2006. Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation. *Cancer Res* 66:11179-11186.
32. Deller, T., Orth, C.B., Del Turco, D., Vlachos, A., Burbach, G.J., Drakew, A., Chabanis, S., Korte, M., Schwegler, H., Haas, C.A., et al. 2007. A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann Anat* 189:5-16.
33. Tussie-Luna, M.I., Michel, B., Hakre, S., and Roy, A.L. 2002. The SUMO ubiquitin-protein isopeptide ligase family member Miz1/PIASxbeta /Siz2 is a transcriptional cofactor for TFII-I. *J Biol Chem* 277:43185-43193.
34. Hakimi, M.A., Dong, Y., Lane, W.S., Speicher, D.W., and Shiekhattar, R. 2003. A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. *J Biol Chem* 278:7234-7239.
35. Ku, M., Sokol, S.Y., Wu, J., Tussie-Luna, M.I., Roy, A.L., and Hata, A. 2005. Positive and negative regulation of the transforming growth factor beta/activin target gene goosecoid by the TFII-I family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 25:7144-7157.
36. Enkhmandakh, B., Bitchevaia, N., Ruddle, F., and Bayarsaihan, D. 2004. The early embryonic expression of TFII-I during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* 4:25-28.
37. van Hagen, J.M., van der Geest, J.N., van der Giessen, R.S., Lagers-van Haselen, G.C., Eussen, H.J., Gille, J.J., Govaerts, L.C., Wouters, C.H., de Coo, I.F., Hoogenraad, C.C., et al. 2007. Contribution of CYLN2 and GTF2IRD1 to

- neurological and cognitive symptoms in Williams Syndrome. *Neurobiol Dis* 26:112-124.
38. Levitin, D.J., Cole, K., Chiles, M., Lai, Z., Lincoln, A., and Bellugi, U. 2004. Characterizing the musical phenotype in individuals with Williams Syndrome. *Child Neuropsychol* 10:223-247.
39. Hickok, G., Bellugi, U., and Jones, W. 1995. Asymmetrical ability. *Science* 270:219-220.
40. Steinbach, J.P., and Weller, M. 2004. Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Neurooncol* 70:245-254.
41. Zhao, C., Aviles, C., Abel, R.A., Almlı, C.R., McQuillen, P., and Pleasure, S.J. 2005. Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval. *Development* 132:2917-2927.
42. Pantoja, C., and Serrano, M. 1999. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18:4974-4982.
43. Lane, D.P. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Keuker JJ, V.-H.G.a.F.E. 2001. How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Res Protoc* 7:211-221.
45. Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.

Figure legends

Figure 1. Gene Targeting of *Gtf2i*

(A) Schematic targeting strategy. *Top*: partial restriction map of wild-type genomic DNA encompassing exons 1 (grey box), 2, 3, 4 and 5 of the *Gtf2i* locus (filled boxes) (B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Bg, *Bgl*II); the translation initiator sites in the wild type (*) and targeted (**) alleles are indicated. Arrows indicate the location of the primers used for RT-PCR analysis. *Middle*: The targeting vector contains the *PGK-neo* (open box) and *lox511* sequences (filled triangle). *Bottom*: Predicted targeted allele resulting from the homologous recombination. The stippled box indicates the location of the probe used for Southern blot, recognizing *Eco*RI DNA fragments of 14,7 kb (wild-type allele) and 9,7 kb (targeted allele). (B) Representative Southern blot of mouse tail DNA isolated from newborn mice derived from crosses between *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} mice and hybridized to probe A. The expected pattern of bands was obtained in each of the genotypes *Gtf2i*^{+/+}; *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} and *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice. (C) RT-PCR analysis with primers located in exons 1 and 4 (1) or 2 and 4 (2) of *Gtf2i* on mRNA from *Gtf2i*^{+/+}, *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} and *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice. Transcripts lacking exon 2 are observed in heterozygous and homozygous mutant mice (1), while no amplicon was obtained with exon 2 and 4 primers in *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2} mice (2). (D) Western blot of total protein extract from MEFs (*Gtf2i*^{+/+}; *Gtf2i*^{+/ Δ ex2} and *Gtf2i* ^{Δ ex2/ Δ ex2}, lanes 1-3) and COS7 cells transfected with a *Gtf2i* cDNA lacking the first four exons (lane 4). Bands corresponding to the wild-type and truncated Δ 140GTF2I proteins are shown.

Figure 2. Growth properties of *Gtf2i* mutant MEFs

(A) Spontaneous immortalization curves of eleven independent MEFs cultures of early passage (P1) derived from six different embryos showing earlier immortalization in $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ and later in $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ cells. (B) Saturation rate of 10^6 cells plated by triplicate and counted every three days until they reached the maximum score. A poorer saturation rate was observed in $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ cells. (C) Proliferation of immortal MEFs. Three independent experiments per genotype were performed and each time point was done by triplicate. The fastest proliferation was observed in $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ while $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ cells performed the worst. (D) Re-entry into S-phase after serum deprivation. The percentage of cells in S-phase was measured at the indicated times after serum stimulation. Again $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ MEFs showed the lowest rate of S-phase re-entry. $Gtf2i^{+/+}$, open rhombus; $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ grey squares; $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ black triangles. All values are expressed as mean \pm s.d.

Figure 3. Quantification of GTF2I isoform mRNAs and subcellular localization of the Δ 140GTF2I protein.

(A) (Left) Schematic representation of the *Gtf2i* locus and the alternative transcripts found encoding the different GTF2I isoforms. Filled rectangles represent the exons present while open rectangles represent the exons missing in each corresponding mRNA; the exon number is indicated on the top and the length of each exon in bp is shown below. (Right) Interaction plot showing the average relative quantification of expression level means of the isoform mRNAs among genotypes. A switch in the relative abundance of the Δ versus β isoform mRNAs is evident in $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ animals with respect to $Gtf2i^{+/+}$ and $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ mice (ANOVA analysis, $P=0.0003$). (B) Subcellular localization of endogenous GTF2I detected with the anti-GTF2I antibody in MEFs. The genotype of the cells is shown in the bottom. A similar nuclear localization

pattern of $\Delta 140\text{GTF2I}$ and wild-type proteins was confirmed by DAPI staining in all cases. Scale bar: $10\mu\text{m}$.

Figure 4. Embryonic abnormalities and craniofacial dysmorphology in mutant mice.

(A) H&E staining, Ki67 labeling and TUNEL assay of representative sections from normal (top) and abnormal (bottom) E7.5 embryos derived from crosses between heterozygous ($Gtf2i^{+/\Delta ex2}$) females and homozygous ($Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$) males. The percentage of abnormal embryos observed at this stage was $> 25\%$. Abnormal embryos lacking detectable embryonic layers by H&E staining are likely to correspond to nonviable $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ embryos. Normal embryos displayed high levels of Ki67-positive cells while they are no detectable in abnormal embryos. No differences were observed in the TUNEL staining. (B) Morphologic abnormalities in $Gtf2i$ mice at 8 weeks of age. (Left) The histogram shows the relative average distance from the tip of the nose to the proximal occipital suture ($n=10$ per genotype). Pair wise comparisons revealed statistically significant differences between genotypes (Tukey test; $P=0,003$ and $P=0,048$ for $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ and $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ relative to $Gtf2i^{+/+}$, respectively). On the right, a representative photograph of the dissected cranial structure per genotype is shown. A shorter snout could be clearly appreciated in the mutant mice, more subtle in heterozygous $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ animals. $Gtf2i^{+/+}$, open square; $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$, grey square; $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$, black square.

Figure 5. Neurobehavioral phenotype.

(A) Locomotor activity. A decrease in the vertical locomotor activity measured in the actimetry box was observed in $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ mice ($P= 0.02$). (B) Lit/dark box. $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$

mice showed an enhanced anxiety level as revealed by increased latency of the first entry ($P= 0.01$) in the lit compartment and the lower activity in the lit compartment ($P = 0.02$). $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ behaved similarly to wild-type mice. (C) Elevated Plus/Maze. Enhanced anxiety level was manifested in the $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ as indicated by the reduced percentage of entries in the open arms during the elevated plus-maze paradigm ($P = 0.01$). (D) Active avoidance. $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ mice exhibited an improvement of the learning task in the active avoidance paradigm on day 6 ($P = 0.02$). (E) Acoustic sensitivity. Enhanced sensitivity to an acute tone of 2800 Hz was observed in $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ mice when the tone was emitted at 65dB as demonstrated by a longer lasting freezing behavior ($P = 0.02$). $Gtf2i^{+/+}$, open square; $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$, grey square; $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$, black square. Each genotype groups are composed only by males (n=10). All data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey *post hoc* comparisons. Data are expressed as mean \pm s.e.m.

Table 1. Genotypes' distribution in the offspring of $Gtf2i^{\Delta ex2/\Delta ex2}$ and $Gtf2i^{+/\Delta ex2}$ mouse crosses during embryonic development and at birth.

Mating		Age	Genotype			<i>P</i>
Male	Female		+/+	+/ $\Delta ex2$	$\Delta ex2/\Delta ex2$	
$\Delta ex2/\Delta ex2$	+/ $\Delta ex2$	E8.5-E12.5	-	64	6	$8,3 \times 10^{-13}$
		At Birth	-	131	22	$5,5 \times 10^{-20}$
+/ $\Delta ex2$	+/ $\Delta ex2$	At Birth	167	340	48	$3,7 \times 10^{-18}$

Figure 1

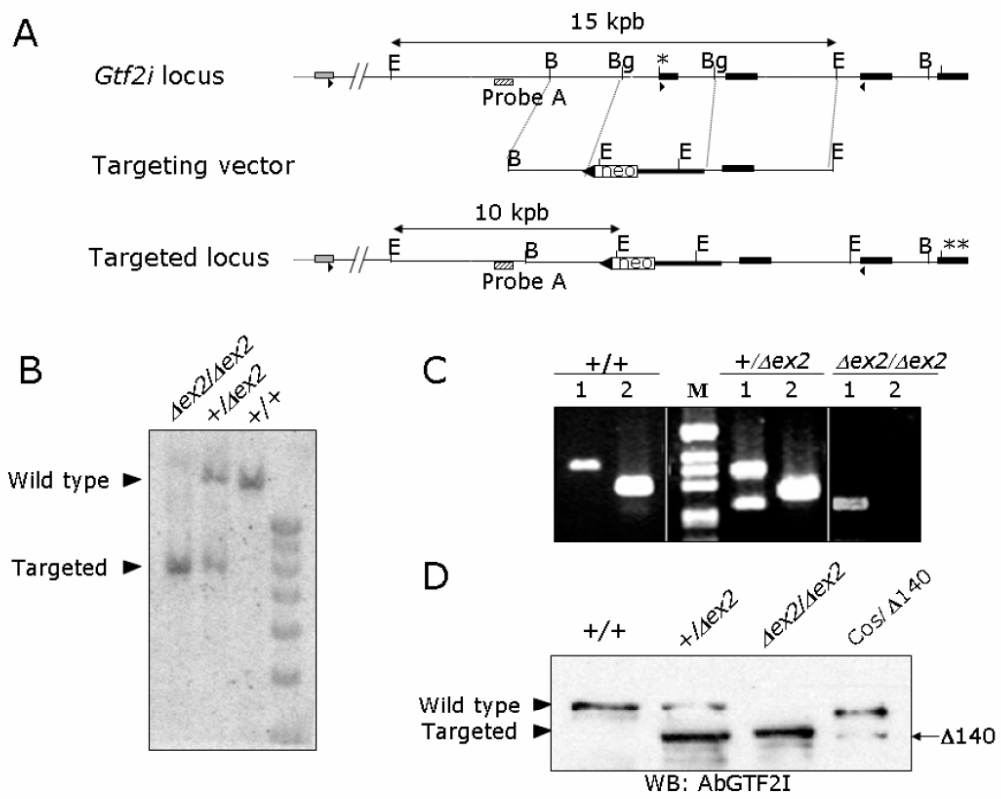


Figure 2

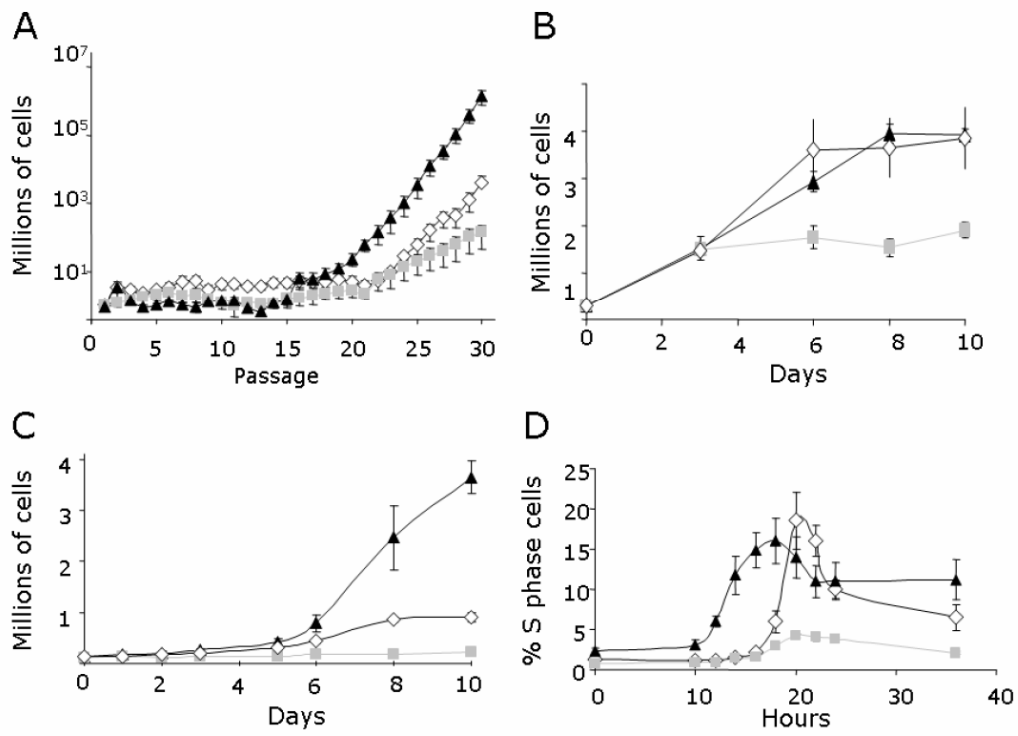


Figure 3

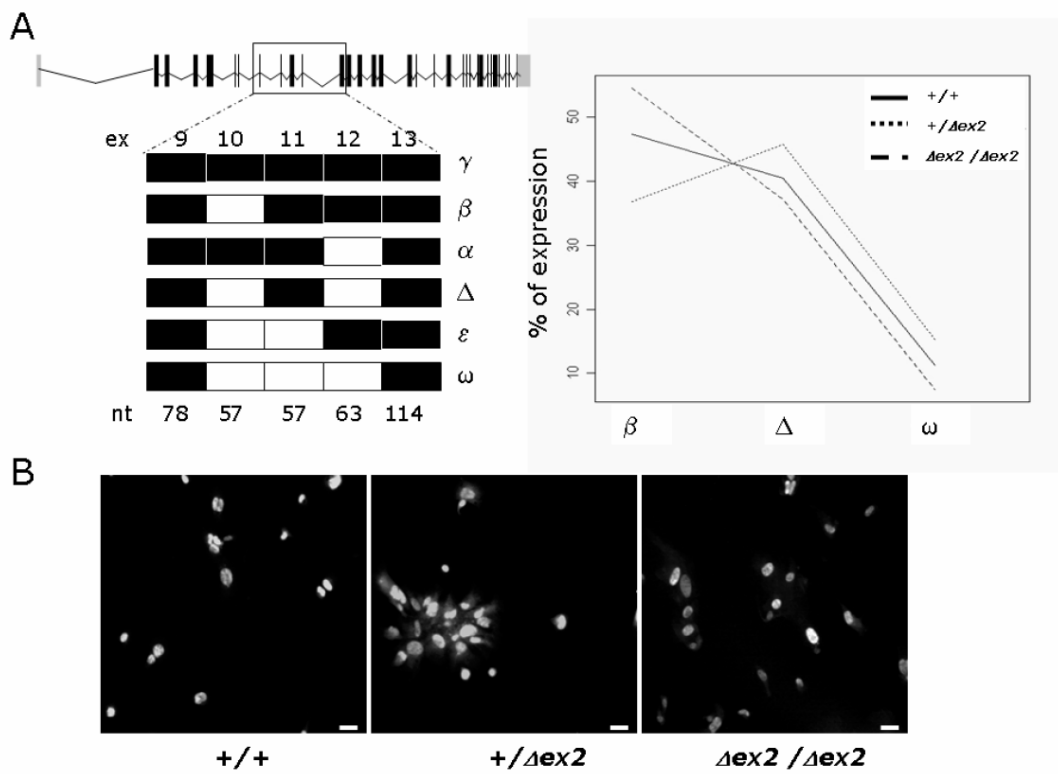


Figure 4

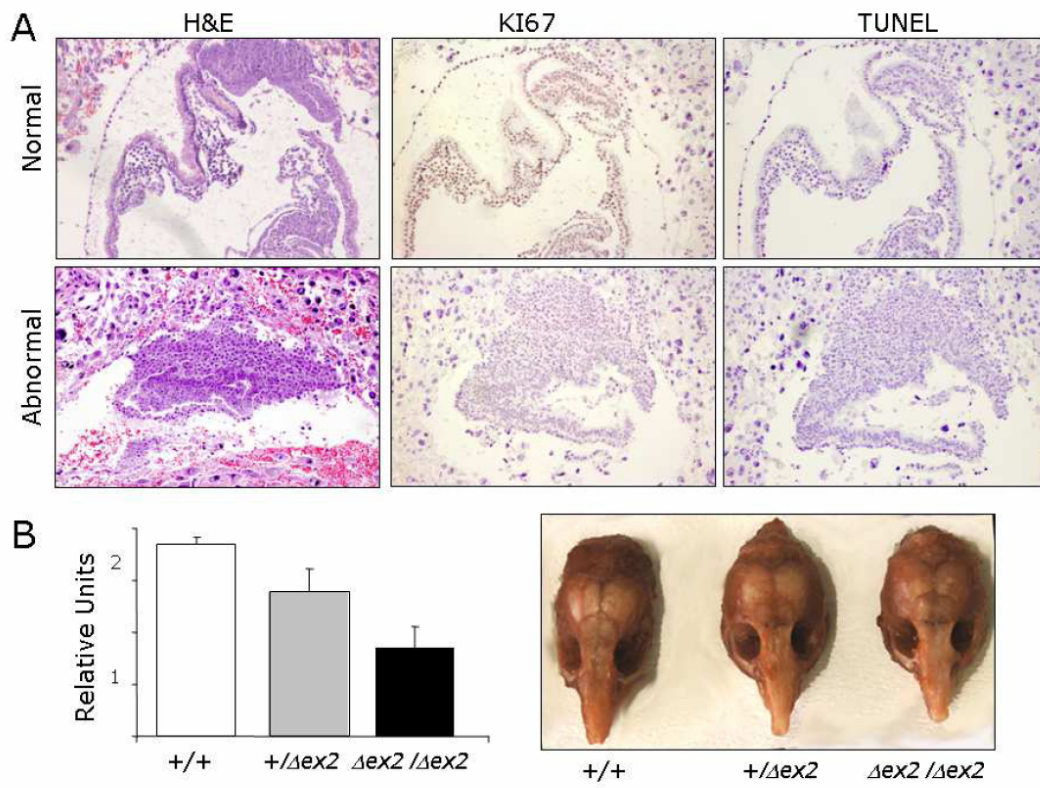


Figure 5

