

**GENES CANDIDATOS PARA LA COMORBILIDAD  
ENTRE TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y TRASTORNOS  
ADICTIVOS**



**Xavier Gallego Moreno**  
**Tesis Doctoral**

**Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad de Barcelona**



# **GENES CANDIDATOS PARA LA COMORBILIDAD ENTRE TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y TRASTORNOS ADICTIVOS**

**Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona  
presentada por**

**Xavier Gallego Moreno**

**Realizada en el Centro de Regulación Genómica (CRG) bajo la dirección  
de la Dra Mara Dierssen Sotos y el Dr Rafael Maldonado López**

**Tesis adscrita al Departamento de Biología Celular y Anatomía  
Patológica de la Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona**

**VºBº de la directora de tesis  
Mara Dierssen Sotos**

**VºBº del tutor de tesis  
Jordi Alberch Vie**

**VºBº del codirector de la tesis  
Rafael Maldonado López**

**El interesado  
Xavier Gallego Moreno**



*Als meus pares*



Para la realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado entre los años 2003-2005 de una beca asociada a proyecto de la “Fundació La Marató de TV3” (Proyecto: 013710) y entre los años 2005-2008 de una beca del Centro de Regulación Genómica (CRG)

Asimismo, la infraestructura del laboratorio de conducta, del laboratorio de experimentación molecular y el material utilizado han sido financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-2001-1231, SAF-2004-02808, SAF2007-60827 y GEN2003-20651-C06-03) y la Comunidad Europea (Phecomp\_037669).





La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Análisis Neuroconductual del Programa de Genes y Enfermedad del Centro de Regulación Genómica. Nuestro grupo está interesado en identificar los factores genéticos y los mecanismos patogénicos responsables de diferentes trastornos neuropsiquiátricos. En los últimos años se han caracterizado en nuestro laboratorio varios genes candidatos cuya disregulación en modelos transgénicos *in vivo* en ratón da lugar a un fenotipo ansioso. La validación y caracterización detallada de algunos de estos modelos permitió detectar alteraciones estructurales que sugerían una clara relación con el trastorno de abuso de sustancias. Esta Tesis Doctoral se ha centrado por tanto en los mecanismos implicados en la comorbilidad entre el abuso de drogas y los trastornos de ansiedad, así como en las regiones cerebrales responsables de la coexistencia de estos dos trastornos en modelos transgénicos. Nos hemos centrado en dos grandes familias de genes, que podrían actuar como interfaz genético en la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y de abuso de sustancias: neurotrofinas por su intervención en el neurodesarrollo y en la neuroplasticidad, y elementos de sistemas de neurotransmisión concretos como son los receptores nicotínicos, cuya implicación en adicción y ansiedad ha sido previamente demostrada a través de estudios farmacológicos. Nuestra hipótesis de trabajo propone la existencia de un componente de desarrollo y un componente funcional en la generación de un cerebro “ansioso y adictivo”. Como aproximación experimental se han utilizado, pues, dos modelos: 1/ un ratón con sobreexpresión del receptor de la neurotrofina-3, TrkC (TgNTRK3), ya que se ha visto implicado en plasticidad, proliferación y diferenciación celular de un sistema con una posible intervención patogénica en patología dual, como es el sistema noradrenérgico, y 2/ un modelo transgénico con sobreexpresión de las subunidades,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$  de receptores nicotínicos (TgCHRNA3/A5/B4), que forman un cluster genético, candidato para el desarrollo de trastornos psiquiátricos y adicción. Para determinar los efectos de la sobreexpresión de estos genes en la aparición de la patología dual se han realizado estudios farmacológicos con drogas de abuso como la morfina o la nicotina. Los resultados de esta Tesis Doctoral reflejan niveles diferentes de caracterización para cada uno de los modelos estudiados. Ello es debido a que: 1/ el nivel de caracterización basal previamente realizada en el laboratorio era diferente, y 2/ el papel funcional de cada una de las proteínas es diferente. Así, mientras que el modelo de sobreexpresión del receptor de la neurotrofina 3 (TrkC),

había sido caracterizado anteriormente como un modelo de ansiedad, en el caso del modelo de sobreexpresión de los receptores nicotínicos ha sido necesario realizar en una primera fase, la validación comportamental (isomorfismo) y farmacológica.

Parte de estos estudios se han realizado en colaboración con otros laboratorios. Así, una parte de los estudios farmacológicos de esta Tesis se han realizado en el Departamento de Neurofarmacología de la Universidad Pompeu Fabra que dirige el Dr. Rafael Maldonado, co-director de esta Tesis Doctoral, en colaboración con la Dra. Patricia Murtra, dada la amplia experiencia de este laboratorio en el ámbito de los estudios experimentales de drogodependencia. Por otra parte, los estudios electrofisiológicos en el locus coeruleus del TgNTRK3, necesarios para determinar la funcionalidad de esta región, se realizaron en el Departamento de Farmacología de la Universidad del País Vasco que dirige el Dr. Joseba Pineda en colaboración con la Dra Teresa Zamalloa, puesto que nuestro laboratorio no dispone del equipamiento para realizar este tipo de experimentos.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral están pendientes de publicación en dos manuscritos originales que recogen la mayor parte de los resultados obtenidos. Una parte de éstos sin embargo ha sido incluida en otros dos artículos originales previamente publicados, en los que figuro como co-autor. Mi participación concreta queda reflejada en la sección "Anexo". Además durante esta Tesis he colaborado en otros proyectos del laboratorio y he participado en la redacción de tres artículos.

<b>PRESENTACIÓN</b> .....	13
<b>ÍNDICE</b> .....	17
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	25
1.COMORBILIDAD ENTRE TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y ABUSO DE DROGAS .....	27
2.REGIONES CEREBRALES COMUNES A LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y DE ABUSO DE DROGAS .....	31
2.1. Regiones del troncoencéfalo: El LC.....	32
2.2. La amígdala.....	35
2.3. La corteza prefrontal (PFC).....	36
2.4. El NAc .....	38
2.5. El BNST.....	39
2.6. El hipotálamo.....	40
3.MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PATOLOGÍA DUAL .....	41
4.FENOMENOLOGÍA DE LA PATOLOGÍA DUAL.....	46
4.1. Sistema opioide y ansiedad .....	48
5.GENES CANDIDATOS PARA EXPLICAR LA PATOLOGÍA DUAL .....	49
5.1. HIPÓTESIS NEUROTRÓFICA: Neurotrofinas y sus receptores .....	51
5.1.1. Neurotrofinas en el LC .....	52
5.2. HIPÓTESIS FUNCIONAL: Sistema Nicotínico Colinérgico .....	55
5.2.1. Nicotina y ansiedad.....	57
5.2.2. El papel de la nicotina en el sistema de recompensa y el aprendizaje condicionado .....	58
5.2.3. nAChRs y trastornos neuropsiquiátricos .....	59
5.2.4. Cluster genómico candidato a la comorbilidad entre trastornos adictivos, ansiedad y epilepsia .....	60
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	63
1.HIPÓTESIS .....	65
2.OBJETIVOS .....	65

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	67
1.ANIMALES .....	69
2.CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	70
3.ANIMALES CON SOBREEXPRESIÓN DEL GEN NTRK3.....	71
3.1. Colocalización de neuronas TH/TrkC positivas en el LC.....	71
3.1.1. Inmunofluorescencia doble .....	71
3.2. Estudio farmacológico.....	72
3.2.1. Fármacos .....	72
3.2.2. Efectos agudos de la morfina en el TgNTRK3 .....	73
3.2.2.1. Test de inmersión de cola .....	73
3.2.2.2. Test de la placa caliente.....	73
3.2.2.3. Actividad locomotora .....	73
3.2.3. Desarrollo de la tolerancia y sensibilización a los efectos de la morfina en el TgNTRK3 .....	74
3.2.4. Estudio del síndrome de abstinencia a la morfina en el TgNTRK3...74	
3.2.4.1. Provocación del síndrome de abstinencia en el TgNTRK3 tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de morfina.....	75
3.2.4.2. Efecto de la clonidina sobre el síndrome de abstinencia en el TgNTRK3 tras desarrollar dependencia mediante dosis constantes de morfina .....	75
3.2.4.3. Electrofisiología: Estudio de la funcionalidad de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos del LC durante la dependencia a morfina en el TgNTRK3.....	76
3.2.4.4. Provocación del síndrome de abstinencia en el TgNTRK3 tras desarrollar dependencia mediante dosis constantes de morfina.....	76
3.2.4.5. Laberinto circular elevado (O-Maze): Estudio de la respuesta ansiosa en ratones TgNTRK3 durante la abstinencia a morfina.....	77
3.2.5. Hibridación in situ: Estudio de la expresión de TrkC, TrkB y sus ligandos NT-3 y BDNF en el LC .....	77
3.2.6. Western Blot: Cuantificación de los niveles de TH durante la dependencia a morfina en el TgNTRK3 .....	78

4. TRANSGÉNICOS DE SOBREENPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 3$ , $\alpha 5$ y $\beta 4$ DE nAChRS.....	80
4.1. Western Blot.....	81
4.2. Caracterización conductual.....	82
4.2.1. Pruebas neurosensoriales (Protocolo SHIRPA).....	82
4.2.2. Pruebas sensoriomotoras.....	84
4.2.2.1. Prueba de equilibrio.....	84
4.2.2.2. Prueba de la percha.....	84
4.2.3. Actividad locomotora.....	84
4.2.4. Campo abierto.....	85
4.2.5. Paradigma luz-oscuridad.....	85
4.2.6. Test de miedo condicionado.....	86
4.3. Estudio farmacológico.....	86
4.3.1. Fármacos.....	87
4.3.2. Estudio del efecto convulsivante de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4.....	87
4.3.3. Estudio del efecto reforzador de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4.....	87
4.3.4. Reconocimiento de objetos en el campo abierto tras administración de nicotina.....	88
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE LA CO-MORBILIDAD DE TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y ABUSO DE SUSTANCIAS EN EL MODELO DE SOBREENPRESIÓN DE NTRK3.....	93
1.1. Caracterización morfológica y funcional de estructuras clave en la co- morbilidad: El LC.....	94
1.1.1. Caracterización morfométrica del LC en el ratón TgNTRK3.....	94
1.1.2. El TgNTRK3 muestra un incremento de neuronas TH/TrkC positivas en el LC.....	94
1.1.3. La sobreexpresión de NTRK3 incrementa la actividad basal de neuronas noradrenérgicas del LC y altera las adaptaciones funcionales producidas en este núcleo como consecuencia de la administración crónica de morfina.....	96

2.CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL PERFIL DE RESPUESTA A LA MORFINA EN EL RATÓN TGNTRK3.....	97
2.1. El ratón TgNTRK3 mostró una menor sensibilidad a los efectos agudos de la morfina.....	97
2.2. La sensibilización locomotora inducida por la morfina y el desarrollo de la tolerancia a su efecto antinociceptivo no se modificaron por la sobreexpresión de TrkC.....	99
2.3. El síndrome de abstinencia no se modificó en el TgNTRK3 cuando la dependencia se indujo mediante dosis crecientes de morfina .....	100
2.4. Efecto de la clonidina sobre la respuesta conductual del TgNTRK3 durante la abstinencia a morfina tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de la droga.....	101
2.5. Efecto de la clonidina en la actividad del LC durante la abstinencia a morfina tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de la droga .....	102
2.6. El síndrome de abstinencia se intensificó en el TgNTRK3 cuando la dependencia se indujo mediante dosis constantes de morfina .....	103
2.7. Modificaciones en el comportamiento ansioso en el TgNTRK3 durante la abstinencia a morfina.....	105
3.DISREGULACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA DE NT-3, BDNF Y SUS RECEPTORES TRKC Y TRKB DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA CON DOSIS CRECIENTES DE MORFINA Y DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA EN LOS RATONES TGNTRK3.....	106
4.LA DISREGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NTRK3 NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE TH EN EL LC .....	109
5.CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE SOBREEXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ 3, $\alpha$ 5 y $\beta$ 4 DE nAChRs.....	111
5.1. Caracterización del ratón TgCHRNA3/A5/B4 .....	111
5.1.1. Expresión de las subunidades $\alpha$ 3, $\alpha$ 5, y $\beta$ 4 en el ratón TgCHRNA3/A5/B4 .....	111
5.1.2. El TgCHRNA3/A5/B4 presenta un incremento en los sitios de fijación para nicotina .....	113
5.2. Caracterización conductual del ratón TgCHRNA3/A5/B4.....	114

---

5.2.1. El TgCHRNA3/A5/B4 no muestra alteraciones neurológicas significativas.....	114
5.2.2. Alteraciones de la conducta relacionada con la ansiedad en los ratones TgCHRNA3/A5/B4 .....	116
5.2.3. La actividad locomotora del TgCHRNA3/A5/B4 se incrementa en un entorno novedoso .....	118
5.2.4. El TgCHRNA3/A5/B4 mostró alteraciones en memorias de miedo condicionado bajo condiciones no contextuales .....	119
5.3. Caracterización farmacológica del ratón TgCHRNA3/A5/B4.....	119
5.3.1. La sobreexpresión de CHRNA3/A5/B4 produce hipersensibilidad a los efectos convulsivantes de la nicotina .....	119
5.3.2. Estudio del efecto adictivo de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4 .....	120
5.3.3. Reconocimiento de objetos en el campo abierto tras administración aguda de nicotina.....	121
5.4. Alteraciones en la expresión de las subunidades NR1 y NR2B de receptores glutamatérgicos en la corteza cerebral de los animales TgCHRNA3/A5/B4 .....	122
<b>DISCUSIÓN</b> .....	125
<b>1.CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE LA PATOLOGÍA DUAL EN EL TGNTRK3</b> .....	127
1.1. La sobreexpresión de TrkC provoca una disfunción noradrenérgica .....	128
1.2. La sobreexpresión de TrkC modifica la actividad de neuronas del LC en el síndrome de abstinencia a opiáceos .....	130
1.3. El TgNTRK3 presenta modificaciones en la manifestaciones somáticas de la abstinencia a opiáceos y cambios en la sensibilidad a clonidina .....	132
1.4. El desarrollo de la dependencia mediante dosis constantes de morfina altera las modificaciones somáticas y conductuales asociadas a la abstinencia en el ratón TgNTRK3 .....	133
1.5. La sobreexpresión de TrkC podría modular comportamientos asociados a la recaída de la droga tras períodos prolongados de abstinencia.....	134
1.6. Regulación de la expresión de neurotrofinas y sus receptores en el ratón TgNTRK3 .....	135

1.7. La sobreexpresión de TrkC produce cambios adaptativos a nivel celular frente a la exposición a opiáceos.....	137
2.CONCLUSIÓN DEL TGNTKR3.....	138
3.CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE LA PATOLOGÍA DUAL EN EL TGCHRNA3/A5/B4.....	139
3.1. Validación del modelo TgCHRNA3/A5/B4.....	140
3.2. Validación conductual del TgCHRNA3/A5/B4 como modelo de ansiedad.....	142
3.3. La sobreexpresión de las subunidades $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , y $\beta 4$ de nAChRs incrementa las conductas relacionadas con adicción a la nicotina en el ratón.....	144
3.4. Elementos cognitivos en el perfil comportamental del ratón TgCHRNA3/A5/B4: componentes glutamatérgicos.....	145
3.4.1. La sobreexpresión de las subunidades $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , y $\beta 4$ de nAChRs disregula la expresión de subunidades de receptores NMDA en la corteza cerebral y modifica la memoria de reconocimientos de objetos.....	146
3.4.2. La sobreexpresión de CHRNA3/A5/B4 disminuye la respuesta de miedo condicionado dependiente de contexto e incrementa la respuesta de miedo no-contextual.....	147
3.4.3. La sobreexpresión de CHRNA3/A5/B4 produce hipersensibilidad a los efectos convulsivantes de la nicotina.....	147
4.CONCLUSIÓN DEL TGCHRNA3/A5/B4.....	151
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>191</b>
1.ABREVIATURAS.....	193
2.ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS.....	196



Desde hace años, se ha venido observando un aumento significativo de los diagnósticos de comorbilidad entre diversas enfermedades psiquiátricas y trastornos relacionados por el consumo de sustancias, que más comúnmente se conoce como “patología dual” (Rounsaville et al., 1982b; Rounsaville et al., 1982a). Esta situación clínica no es una excepción sino una realidad mayoritaria para todas las conductas adictivas tanto a sustancias integradas (alcohol y tabaco) como no integradas (opiáceos, cocaína, cannabis, etc.) y es también muy frecuente en las enfermedades mentales en las que se presentan conductas adictivas con una prevalencia mucho mayor que en la población general. Los pacientes duales constituyen el 30-50% de la población psiquiátrica y más del 80% de la población toxicómana. En concreto, la comorbilidad de trastornos de ansiedad y trastornos de abuso de sustancias es muy frecuente en el campo de la psicopatología. Se ha planteado que ambos trastornos pueden ser primarios o secundarios (inducidos) por lo que los mecanismos que dirigen su comorbilidad son controvertidos.

En los casos en que el abuso de sustancias es primario, se debe demostrar que los síntomas aparecen durante la intoxicación o tras el primer mes de abstinencia y/o que son secundarios al consumo de la sustancia. El trastorno de ansiedad inducido por sustancias incluye entidades nosológicas en las que la ansiedad es predominante, como las crisis de angustia o trastornos compulsiones. En el caso de trastorno de ansiedad primario, se ha determinado que ésta constituye un factor predisponente, desencadenante y de estabilización del consumo.

## **1. COMORBILIDAD ENTRE TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y ABUSO DE DROGAS**

Un gran número de estudios han demostrado la comorbilidad entre el abuso de drogas y algunas enfermedades psiquiátricas (Barlow, 1997; Regier et al., 1998) (Tabla 1), y están comenzando a mostrar la dimensión del problema de forma que se estima que más de 8 de cada 10 personas que abusan de drogas sufren alguna enfermedad mental. Sin embargo, el trastorno por consumo de sustancias no está especialmente asociado a un determinado trastorno psiquiátrico, ni tampoco el abuso de determinadas drogas está limitado a un diagnóstico psiquiátrico específico. La sustancia de abuso más común es el alcohol, seguido de la

marihuana y la cocaína. Los medicamentos que requieren receta médica, como los ansiolíticos y los hipnóticos, también están incluidos. Esta robusta comorbilidad claramente refleja la posible existencia de factores ambientales, genéticos y/o neurobiológicos comunes en ambas patologías. Sin embargo, no necesariamente implica que exista una relación causa-consecuencia, sea o no su aparición simultánea. De hecho, no en todos los casos las manifestaciones psicopatológicas mejoran cuando los pacientes se mantienen abstinentes. Esto, unido al hecho de que muchos consumidores prefieran determinadas sustancias, sugiere la posibilidad de que algunos individuos intenten automedicarse de su trastorno psiquiátrico con el consumo concomitante de drogas. Es por ello que, el término de patología dual puede significar tanto que ambos diagnósticos son independientes y ocurren simultáneamente, como que el síndrome psiquiátrico puede haber sido inducido por sustancias o incluso que el trastorno de consumo es secundario a un trastorno psiquiátrico. Así, podría ser que el abuso de drogas tuviera como consecuencia la aparición subsiguiente de enfermedades mentales, que los trastornos psiquiátricos dieran lugar a conductas de abuso de sustancias, o que tanto los trastornos psiquiátricos como el abuso de drogas aparecieran como consecuencia de factores de susceptibilidad o de riesgo comunes.

Uno de los casos más frecuentes de comorbilidad, es el que asocia el abuso de drogas con trastornos de ansiedad, siendo la relación entre ambos trastornos bastante compleja desde el punto de vista fenomenológico. Es bien conocido el hecho de que personas con trastornos de ansiedad tienden al consumo de drogas para paliar la ansiedad, y que, a su vez, el consumo de ciertas drogas y el síndrome de abstinencia provocan episodios de ansiedad o angustia (Lopez et al., 2005). Así, la ansiedad se manifiesta de forma muy frecuente durante periodos de abstinencia a alcohol, benzodiazepinas, y opiáceos, pero también puede aparecer durante la intoxicación con estimulantes, marihuana y alucinógenos (Lopez et al., 2005). De hecho, la falta de identificación y tratamiento de la sintomatología ansiosa pueden empeorar las conductas adictivas y sus consecuencias (Brown et al., 1995; Shrier et al., 2003).

<b>Comorbilidad en cualquier tipo de trastorno de ansiedad, carácter y consumo de drogas</b>					
	<b>Prevalencia (s.e.)</b>	<b>% con trastorno de ansiedad (s.e.)</b>	<b>% con trastorno de carácter (s.e.)</b>	<b>% con consumo de drogas (s.e.)</b>	<b>% con los tres (s.e.)</b>
<b>Cualquier tipo de trastorno de ansiedad</b>	12.6 (0.3)	-	26.1 (1.2)	14.0 (1.0)	5.4 (0.6)
<b>Cualquier tipo de trastorno de carácter</b>	9.5 (0.3)	34.5 (1.5)	-	17.3 (1.2)	7.1 (0.8)
<b>Cualquier tipo de consumo de drogas</b>	9.5 (0.3)	18.6 (1.4)	17.5 (1.2)	-	7.2 (0.8)

**Tabla 1. Porcentaje de comorbilidad entre trastorno de ansiedad, carácter y consumo de drogas. Adaptado de Regier et al., 2001.**

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la comorbilidad entre abuso de drogas y trastornos de ansiedad: (1) que el trastorno psiquiátrico sea primario con abuso de sustancias secundario. En este modelo las drogas intentarían revertir las anomalías basales de la patología ansiosa; (2) que el trastorno por abuso de sustancias sea primario y el trastorno psiquiátrico, secundario. Este grupo se basaría en que la administración continuada de drogas provocaría cambios neuroadaptativos, que llevarían a un trastorno de ansiedad; (3) que ambos trastornos fueran coexistentes. Dentro de este tercer grupo, existen a su vez dos posibilidades: (A) que ambos trastornos tengan un origen común (modelo de factores comunes), lo cual indica que pueden constituir dos manifestaciones sintomatológicas de un mismo proceso de base, con componentes genéticos y neurobiológicos similares; (B) que ambos trastornos tengan un origen independiente (modelo bidireccional) de forma que cada uno de los trastornos puede incrementar la vulnerabilidad del otro.

Entre los factores biológicos subyacentes a la patología dual se han sugerido a/ la existencia de elementos de vulnerabilidad comunes, como factores genéticos o la exposición a un factor ambiental (estrés, trauma, etc.) predisponente común a ambas enfermedades (Figura 1), b/ la implicación de regiones cerebrales comunes en ambas enfermedades, o c/ el hecho de que se presenten con frecuencia en la

adolescencia, una etapa más susceptible a cambios neuroplásticos (Christie et al., 1988; Burke et al., 1994; Regier et al., 1998; Simkin, 2002; Lubman et al., 2007). El inicio del consumo de drogas de abuso en este periodo es más susceptible de desencadenar la aparición de enfermedades mentales, al igual que la aparición temprana de trastornos psiquiátricos puede incrementar la vulnerabilidad al abuso de drogas.

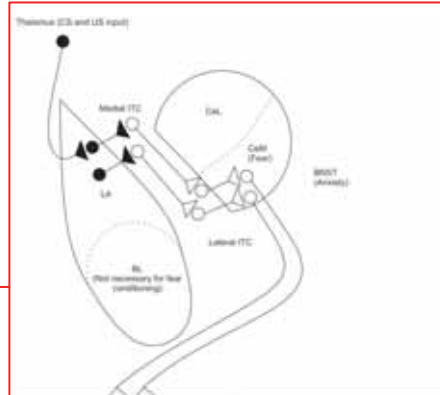
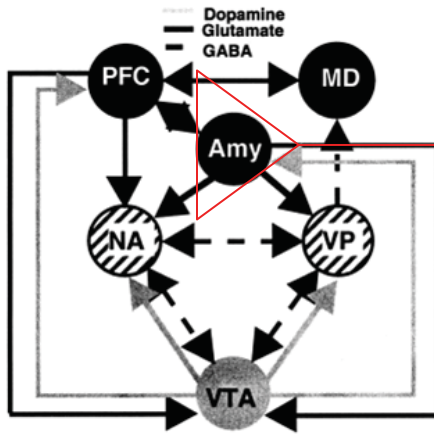
Todo ello se puede resumir en una hipótesis morfogenética y/o funcional en dos niveles que propone que tanto el abuso de drogas como los trastornos psiquiátricos sean la expresión sintomática de alteraciones preexistentes en circuitos neuronales comunes, y/o que ambos cuadros presenten elementos celulares comunes de forma que el abuso crónico de una droga produzca cambios neuroadaptativos en circuitos neuronales similares a los producidos en trastornos psiquiátricos (Brady and Sinha, 2005).



**Figura 1. Comorbilidad entre trastornos psiquiátricos y abuso de drogas.** Factores ambientales y genéticos que contribuyen al desarrollo de trastornos psiquiátricos (A) o al abuso de drogas (B). Respuestas maladaptativas producidas por alteraciones crónicas en regiones cerebrales implicadas en el sistema emocional o por el consumo crónico de una droga (C). Obtenido de Brady and Sinha, 2005.

## **2. REGIONES CEREBRALES COMUNES A LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y DE ABUSO DE DROGAS**

Los argumentos expuestos sugieren la implicación de regiones cerebrales comunes a los trastornos de ansiedad y abuso de sustancias (Figura 2). Para determinar la cartografía de su comorbilidad, hemos de considerar por tanto, que ésta es probablemente consecuencia de alteraciones en el procesamiento de la información con componente emocional, que afectan a la anticipación, interpretación y almacenamiento de los estímulos percibidos. El procesamiento de estímulos emocionales posee tres componentes según la teoría clásica de las emociones (Mac, 1949; Gray, 1983; Pratt, 1992; Papez, 1995; LeDoux, 2000): un componente evaluador, que valora la aversión o la apetencia por el estímulo; un componente expresivo, que se concreta en comportamientos específicos y reacciones somáticas, y un componente de experiencia subjetiva. Todos estos elementos requieren de la participación del sistema límbico, un complejo sistema neurológico formado por diferentes regiones cerebrales interconectadas, situadas caudalmente a la corteza cerebral y rostrales al tálamo, entre cuyas funciones están el control de las emociones y la formación de memorias asociativas (LeDoux, 2000). Sin embargo, otras estructuras, como el locus coeruleus (LC), principal núcleo catecolaminérgico central, podría ser también un elemento clave en la comorbilidad, ya que se ha demostrado su implicación tanto en trastornos de ansiedad (Berridge and Waterhouse, 2003; Holmes and Picciotto, 2006), como en la dependencia opiácea (Ivanov and Aston-Jones, 2001; Berridge and Waterhouse, 2003). Un segundo aspecto importante y en el que nos centramos en esta Introducción es el hecho de que tanto los trastornos de ansiedad como el abuso de drogas se producen como consecuencia de mecanismos celulares y moleculares comunes que subyacen al aprendizaje o la memoria asociativa. Desde esta perspectiva no pretendemos hacer una revisión exhaustiva de las regiones cerebrales implicadas en la ansiedad o la drogodependencia, sino centrarnos en aquellos aspectos que pueden resultar relevantes para el problema.



Diana anatómica	Signos de miedo/ansiedad
Hipotálamo lateral	Taquicardia, dilatación de la pupila, incremento de la presión sanguínea
Núcleo motor del vago	Defecación, micción, úlceras
Núcleo parabraquial	Angustia respiratoria, jadeo
Área tegmental ventral Locus coeruleus Prosencéfalo basal	Incremento de la vigilancia Incremento de la atención Comportamiento y EEG alterado
Sustancia gris periacueductal	Congelamiento, hipoalgesia
Nervio facial motor	Expresión facial de miedo
Núcleo paraventricular	Liberación de CRH
Otros núcleos aminérgicos	Estado anímico

**Figura 2. Regiones cerebrales implicadas en trastornos de ansiedad y abuso de drogas.** Amy, amígdala; MD, tálamo mediodorsal; NA, núcleo acúmbens; PFC, corteza prefrontal; VP, ventral pallidum; VTA, área tegmental ventral. **Adaptado de Peter W. Salivas y de Panzer et al., 2007**

## 2.1. Regiones del troncoencéfalo: El LC

El LC es el principal origen de las vías noradrenérgicas en el cerebro. Se trata de un núcleo situado en la región troncoencefálica que desempeña un papel regulador en la ansiedad, pero también participa en la dependencia opiácea. Se trata por tanto de un núcleo candidato a participar en la patología dual. Es bien conocido que los trastornos de ansiedad se caracterizan por un incremento de la función noradrenérgica (Berridge and Waterhouse, 2003; Holmes and Picciotto, 2006). En respuesta a la ansiedad o situaciones de miedo, el LC se comporta como un centro de alarma activando la liberación de noradrenalina (NA) y estimulando el sistema nervioso simpático. Estudios realizados en humanos ponen de manifiesto que en pacientes con trastornos de pánico, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y los antagonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos (yohimbina) pueden provocar crisis de angustia frecuentes y graves. La yohimbina (antagonista  $\alpha_2$  adrenérgico), actúa bloqueando la inhibición

de la actividad de las neuronas noradrenérgicas, aumentando, por tanto, la actividad noradrenérgica central. Su administración por vía oral provoca ataques de pánico en aproximadamente el 50% de los pacientes. Esta excesiva reactividad podría estar relacionada con una sensibilidad anormal de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos ( $\alpha_2$ -AR) centrales, cuya disfunción patológica no permitiría la recuperación rápida del sistema noradrenérgico tras la estimulación (Nutt, 1989; Charney and Drevets, 2002). De hecho, existen estudios que demuestran que la administración de clonidina (agonista  $\alpha_2$  adrenérgico) provoca respuestas cardiovasculares aplanadas, lo que sugeriría una hiposensibilidad de los  $\alpha_2$ -AR. En concreto, los pacientes con trastorno de pánico mostraban un incremento significativo del intervalo QT, un índice de la actividad simpática y la capacidad de repolarización, tras la administración de yohimbina y una reducción significativa tras clonidina, no observable en el grupo control (Yeragani et al., 2003).

El LC también está relacionado con el abuso de sustancias (Ivanov and Aston-Jones, 2001; Berridge and Waterhouse, 2003). De hecho este núcleo posee una alta densidad de receptores opiáceos y adrenérgicos (Moore and Bloom, 1979). El LC parece ser además la principal estructura implicada en la expresión de la dependencia a opiáceos (Aghajanian, 1978; Maldonado et al., 1992; Maldonado and Koob, 1993) y presenta una gran hiperactividad neuronal durante la abstinencia que se ha propuesto que está directamente relacionada con las manifestaciones físicas de dicho síndrome (Rasmussen et al., 1990). Esta activación del LC durante la abstinencia opiácea es debida a la combinación de diversos mecanismos. Por una parte, existen fenómenos intrínsecos en el propio LC representados por los cambios adaptativos que se producen durante la administración crónica de opiáceos en el conjunto de mensajeros dependientes del cAMP (Nestler, 1992). Así, el incremento de la actividad adenilato ciclasa (AC) y proteína quinasa que se produce durante la dependencia opiácea contribuye directamente al aumento de la excitabilidad eléctrica de las neuronas del LC en el momento de la abstinencia (Rasmussen et al., 1990). Sin embargo, existen también factores extrínsecos a esta estructura que participan en su activación. Un ejemplo sería el núcleo paragigantocelularis (PGi) que proyecta fibras glutamatérgicas de carácter excitatorio al LC (Ennis and Aston-Jones, 1988). Durante la abstinencia se observa un incremento en la liberación de neurotransmisores excitatorios procedentes de

dicho PGI (Rasmussen and Aghajanian, 1989; Akaoka and Aston-Jones, 1991). Este aumento en la actividad de las aferencias excitatorias se acompaña de un incremento en la sensibilidad de las neuronas del LC a dichos transmisores como consecuencia de los cambios intrínsecos en esta estructura. La confluencia de ambos mecanismos es responsable de la hiperactividad noradrenérgica observada durante la abstinencia (Maldonado et al., 1992; Maldonado, 1997).

Además de las demostraciones de la convergencia estructural de los trastornos de ansiedad y el abuso de sustancias, diversas observaciones demuestran que los pacientes con trastornos de ansiedad tienden al abuso de sustancias depresoras, que disminuyen la actividad del LC, como benzodiazepinas, alcohol u opiáceos, de forma que podrían reducir la sensación de angustia (Ochoa Mangado, 1999; Holmwood, 2002; Conway et al., 2006). Por otra parte, en regiones de proyección del LC, como el hipocampo o la amígdala, se observa una disminución de la densidad de los  $\alpha 2$ -AR (Flugge, 1999; Featherby and Lawrence, 2004), tras estrés crónico, que constituye un elemento predisponente o desencadenante tanto de cuadros de ansiedad como de abuso de sustancias. Esta regulación a la baja de los  $\alpha 2$ -AR tendría como consecuencia final un incremento de la síntesis y liberación de NA en las células noradrenérgicas del LC, debido a la reducción de los mecanismos reguladores sinápticos. En la misma línea, el síndrome de abstinencia a cocaína provocado tras su administración repetida, se acompaña de una desensibilización de los  $\alpha 2$ -AR postsinápticos (Baumann et al., 2004). Además, también se han observado alteraciones de estos receptores en diferentes áreas cerebrales tras la administración crónica de agonistas opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$  (Smith et al., 1983). Estas observaciones sugieren la importancia del LC como posible interfaz neuroanatómico de los trastornos de ansiedad y el abuso de sustancias a través de su influencia sobre regiones cerebrales implicadas en el procesamiento emocional, como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal medial (mPFC), incrementando la transmisión noradrenérgica en estas áreas en respuesta a estímulos aversivos novedosos. Aún así, todavía no está claro si el LC juega un papel principal en ambos trastornos, o por lo contrario las modificaciones que presenta son de carácter compensatorio, en respuesta a alteraciones producidas en otras regiones cerebrales (Charney and Drevets, 2002).



## 2.2. La amígdala

Los trastornos de ansiedad y el abuso de drogas se caracterizan por la aparición de respuestas maladaptativas a estímulos emocionalmente significativos que producen miedo o placer, y que podrían depender de una alteración en su reconocimiento o procesamiento o en la adscripción correcta de significación de los mismos. La amígdala juega un papel muy importante en proporcionar significación biológica a los estímulos, es decir, en otorgar a un estímulo sensorial el componente aversivo o apetitivo (Quirk and Gehlert, 2003). Se trata de una estructura del sistema límbico formada por diferentes subnúcleos, que incluyen amígdala lateral (LA), basolateral (BLA) y central (CeA). La amígdala participa en el procesamiento de la información relacionada con el miedo y en el aprendizaje asociativo del miedo condicionado y en la expresión de la emoción.

La amígdala se ha asociado con trastornos de ansiedad pero también parece estar relacionada con el abuso de drogas. Además de intervenir en el aprendizaje asociativo de estímulos aversivos, la amígdala también es importante en la asociación de estímulos reforzadores o placenteros (Holland and Gallagher, 1999; Everitt and Robbins, 2000). Así, se ha visto que lesiones en la BLA afectan la asociación de estímulos o señales con el efecto recompensante de la droga, disminuyendo la búsqueda compulsiva de ésta (Meil and See, 1997; Simmons et al., 2007). En humanos adictos a la cocaína, también se ha visto una sobreactivación de la amígdala cuando se les ha reexposto a señales relacionadas con la droga (Childress et al., 1999; Bonson et al., 2002).

Una de las posibles hipótesis para explicar su participación en la comorbilidad de ansiedad y abuso de sustancias podría encontrarse en la fisiología de esta estructura. Es bien conocido que la actividad espontánea de la amígdala es una de las más reducidas del sistema nervioso central (SNC) (Pare and Collins, 2000), lo que sugiere que en situación basal está altamente inhibida, como demuestra la manipulación farmacológica de circuitos GABAérgicos inhibitorios en la amígdala (Royer et al., 1999). Así, animales en los que se microinyectaron antagonistas GABAérgicos en la amígdala, exhibieron una conducta ansiosa (Shekhar et al., 2003), poniendo de manifiesto la importancia de la desinhibición de esta estructura

en los trastornos de ansiedad. Por otra parte, se ha sugerido que la inhibición de la transmisión inhibitoria en la BLA induce cambios neuroplásticos intra-amigdalinos responsables del incremento de la conducta de miedo o ansiedad, de forma que la amígdala se ha visto relacionada con la extinción y la consolidación de memorias asociativas, necesarias para una adecuada respuesta conductual. Así, una desinhibición de la amígdala podría provocar una consolidación exagerada de memorias traumáticas (Southwick et al., 1999; McIntyre et al., 2002) o podría afectar a la extinción de éstas (Pitman, 1997; Gorman et al., 2000) con posteriores consecuencias patológicas.

Todo ello sugiere que las asociaciones emocionales formadas en la amígdala pueden ser las responsables de la aparición de conductas patológicas, tales como la búsqueda compulsiva de la droga o de la ansiedad persistente, si esta estructura no se encuentra suficientemente inhibida (Quirk and Gehlert, 2003).

### **2.3. La corteza prefrontal (PFC)**

Las regiones de la PFC, tales como la PFC dorsolateral (dIPFC) o su equivalente en roedores, la mPFC, se supone que actúan junto con regiones "límbicas" de la PFC, como el caso de la corteza orbitofrontal (OFC) para organizar la conducta derivada de los estímulos externos o del contexto. Aunque estas subregiones de la PFC se caracterizan por realizar funciones diferentes, su actuación conjunta sugiere un posible sustrato para la formación de procesos maladaptativos responsables de la mayoría de trastornos psiquiátricos o trastornos adictivos, así como de la comorbilidad entre éstos (Moghaddam and Homayoun, 2008).

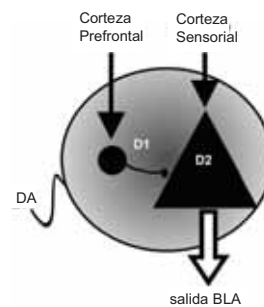
Una de las características de los trastornos adictivos y de los trastornos psiquiátricos es que ambos conllevan cambios neuroplásticos en diferentes regiones cerebrales (Wolf et al., 2003; Lewis and Gould, 2007; Varea et al., 2007), entre las que se encuentra la corteza cerebral. La PFC juega un papel importante en la regulación de la conducta afectiva a través de su interacción con la amígdala lateral, influyendo en el aprendizaje y la expresión conductual. Así, las proyecciones de la PFC hacia la BLA son responsables de suprimir la respuesta neuronal e impedir el condicionamiento asociativo (asociación entre estímulos condicionados

(CS) e incondicionados (US); (Grace and Rosenkranz, 2002; Rosenkranz and Grace, 2002; Rosenkranz et al., 2003).

Tanto los trastornos de ansiedad como el abuso de drogas se caracterizan por la falta de extinción de memorias asociativas, o de forma más específica, por la incapacidad de formar nuevas memorias asociativas (Quirk and Gehlert, 2003). Numerosos estudios (Quirk and Gehlert, 2003; Likhtik et al., 2005) postulan que la extinción es el resultado de la interacción entre la mPFC y la amígdala, resultando en la formación de nuevas memorias que inhiben la respuesta condicionada original. Las memorias formadas de nuevo compiten con las originales, y este proceso está regulado por la mPFC (Rhodes and Killcross, 2004), así como por el sistema dopaminérgico mesolímbico (Grace and Rosenkranz, 2002). Por tanto, incrementos de dopamina (DA) en la BLA (Figura 3) producirían la activación de

receptores D2, encargados de potenciar la acción de la corteza sensorial sobre la BLA, incrementando las respuestas condicionadas, y a la vez, la activación de receptores D1 encargados de atenuar la acción supresora de la mPFC sobre estos inputs sensoriales (Rosenkranz and Grace, 2002), impidiendo de esta manera la extinción de memorias originales. La falta de extinción de memorias asociativas a través del sistema mesolímbico o de una inhibición deficiente de la amígdala puede desencadenar en una respuesta condicionada excesiva, produciendo estados patológicos como trastornos de ansiedad o

comportamientos relacionados con el abuso de drogas, como por ejemplo la búsqueda compulsiva de ésta (drug-seeking). Además, el abuso de drogas puede provocar alteraciones en la transmisión glutamatérgica de la mPFC, sobre el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo acúmbens (NAc), provocando fenómenos como la sensibilización o las ansias de droga (craving) (Quirk and Gehlert, 2003).



**Figura 3. Modulación dopaminérgica de los output de la BLA.** La DA maximiza la respuesta de la BLA provocada por los inputs sensoriales e impide la habilidad de la mPFC para atenuar la respuesta. **Obtenido de Grace et al., 2002**

### 2.4. El NAc

Existen otras estructuras cerebrales que tienen un papel importante en el desarrollo de la adicción y cuya participación en trastornos de ansiedad ha sido recientemente propuesta. Es el caso de la amígdala extendida, complejo que comprende la corteza del NAc, el núcleo medial de la estría terminal (BNST) y la CeA, y que ha sido sugerida como punto de integración de la mayoría de funciones del circuito de recompensa (Leshner and Koob, 1999).

El NAc se ha relacionado con diferentes funciones, aunque se caracteriza principalmente por su implicación en el sistema de recompensa. Se trata de un grupo de neuronas del encéfalo, localizadas en el lugar donde el núcleo caudado y la porción anterior del putamen confluyen lateralmente dispuestos con respecto al *septum pellucidum*. El NAc se puede dividir en dos estructuras, la zona central y la corteza. Estas estructuras tienen diferente morfología y función. El NAc y el bulbo olfatorio forman colectivamente la parte ventral del cuerpo estriado, que es parte de los ganglios basales. Las neuronas eferentes del NAc proyectan sus axones hacia sus análogos de la parte ventral del globo pálido (pálido ventral). Éste a su vez proyecta hacia el núcleo medio dorsal del núcleo dorsal del tálamo, que proyecta hacia la PFC. Entre otras eferencias del NAc se incluye las conexiones con la sustancia nigra y la formación pontina reticular. Las principales aferencias del NAc son las cortezas prefrontales asociativas, la amígdala y las neuronas dopaminérgicas localizadas en la VTA, que se conecta a través de la vía mesolímbica. Así pues se describe frecuentemente al NAc como parte del bucle cortico-estriado-talamico-cortical. Múltiples son las observaciones experimentales que, mediante el empleo de la microdiálisis cerebral, han permitido demostrar respuestas conductuales de naturaleza motivacional, en relación con las propiedades motivacionales de diversos estímulos. Asimismo, mediante la infusión intracerebral de drogas se ha podido postular que las distintas subregiones del NAc, están involucradas en la adquisición y expresión de conductas motivacionales. La actividad dopaminérgica en el NAc está relacionada con los efectos reforzadores de estímulos naturales como la comida o el sexo. Asimismo se ha observado su activación con la administración de drogas, y tiene una importante relevancia en fenómenos relacionados con el abuso de éstas. La corteza del NAc está

relacionada con el procesamiento de aprendizajes asociativos y, por ende, la adquisición de conductas motivacionales asociadas a la subregión límbica de forma que la adquisición de conductas de motivación se consolida en la corteza externa del NAc y la expresión de éstas se determina en la porción central de la misma, de forma que ciertos autores han catalogado a esta subregión como una estructura límbica interfaz entre la motivación y la acción. De interés para nuestro trabajo, el NAc también podría estar involucrado en trastornos de ansiedad, ya que se ha observado un incremento de la liberación de DA tras exposiciones a estímulos aversivos (Ferrari et al., 2003), y concretamente se ha relacionado con la adquisición y la expresión de respuestas aversivas condicionadas (Schultz and Dickinson, 2000; Schultz et al., 2003).

## **2.5. El BNST**

El BNST es una región que representa una extensión de la CeA y, por tanto, integrada en lo que denominamos extensión amigdalina, que reúne estructuras importantes relacionadas con la consolidación de fenómenos motivacionales. Las regiones cerebrales encargadas de la expresión de las emociones pueden ser activadas directamente a través del BNST en lugar de la CeA, por lo que se le relaciona también con trastornos de ansiedad durante la exposición a estímulos sensoriales ambiguos o poco explícitos (Charney and Drevets, 2002). Su relación con abuso de sustancias deriva de observaciones de su activación a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos durante el síndrome de abstinencia a opiáceos, secundaria al incremento de la liberación de NA (Aston-Jones et al., 1999). Esta activación sería responsable de los estados de ansiedad propios de la abstinencia, que por tanto pueden ser aliviados con el consumo de la droga (Gray, 1996; Lejoyeux et al., 2000). Por otra parte, diversas observaciones experimentales demuestran la capacidad de las sustancias adictivas de incrementar la concentración de DA en el BNST, alterando el procesamiento hedónico y el aprendizaje o la motivación por los refuerzos naturales, pero incrementando a su vez el aprendizaje y la motivación por el efecto recompensante de la droga (Aston-Jones and Harris, 2004). Ello sugiere que las drogas de abuso facilitarían el aprendizaje asociativo, mediante la estimulación del sistema dopaminérgico

mesocorticolímbico, no solamente en el NAc, sino también en regiones que integran la extensión amigdalina.

### 2.6. El hipotálamo

Uno de los factores comunes implicados en los trastornos psiquiátricos y el abuso de drogas es el papel que desempeña el estrés durante el desarrollo de la adicción y la recaída a la droga. De hecho, se sabe que la exposición al estrés incrementa la vulnerabilidad a la adicción de una droga (Sinha, 2001; Goeders, 2003; Anderson et al., 2006) pero también desencadena los ataques de angustia propios del trastorno de pánico y es un elemento gatillo en los trastornos de ansiedad. Es por ello que el hipotálamo podría jugar un papel importante en la comorbilidad, ya que su activación incrementa la presencia de la hormona de liberación de corticotropina (CRH), crucial en la respuesta al estrés e implicado en la fisiopatología de la ansiedad así como también en trastornos adictivos (Weiss et al., 2001). La activación del hipotálamo tras estrés produce un incremento de la liberación de CRH, que a su vez potencia el sistema de recompensa dopaminérgico, e induce al consumo de la droga (Piazza and Le Moal, 1998). Además el estrés produce una sensación de malestar y un incremento de la ansiedad (Sinha et al., 2003; Grillon et al., 2007) responsables de la búsqueda compulsiva de la droga en individuos dependientes (Shalev et al., 2002; Aston-Jones and Harris, 2004). Los circuitos cerebrales que controlan las respuestas al estrés también participan en las manifestaciones motivacionales de la abstinencia a opiáceos. Así, el síndrome de abstinencia a opiáceos se relaciona con una elevación importante en los niveles extracelulares de CRH en áreas del sistema mesolímbico y especialmente en la amígdala (Cummings et al., 1983; Heinrichs et al., 1995; Koob, 1996). Esta alteración de la función del CRH límbico parece mediar los síntomas relacionados con el estrés que acompañan al síndrome de abstinencia. Además, durante la abstinencia a opiáceos, el CRH está también incrementado en el eje hipotálamo-hipofisario, dando lugar a una alteración de éste que persiste incluso tras el síndrome de abstinencia agudo (Kreek et al., 1984). Cambios similares de los niveles extracelulares de CRH han sido descritos durante la abstinencia a otras drogas de abuso como en el caso de los cannabinoides (Rodríguez de Fonseca et

al., 1999; Hungund et al., 2002), el etanol (Koob, 1999) o los psicoestimulantes (Richter and Weiss, 1999).

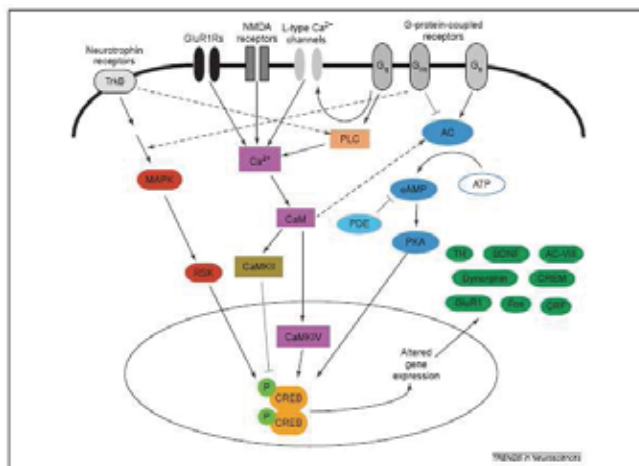
### **3. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PATOLOGÍA DUAL**

Se ha propuesto que tanto los trastornos de ansiedad como el abuso de drogas se producen debido a mecanismos celulares y moleculares comunes que subyacen al aprendizaje y la memoria asociativa. Así, tanto en los trastornos de ansiedad como tras la administración de drogas de abuso se producen cambios adaptativos a largo plazo en el cerebro que no sólo contribuyen a la consolidación del proceso adictivo o de las memorias de miedo, sino que parecen participar en la mayor vulnerabilidad a la recaída tras un periodo prolongado de abstinencia. Estos cambios han comenzado a ser identificados en los últimos años y se conocen toda una serie de modificaciones neurobiológicas persistentes, algunas de las cuales podrían explicar la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y abuso de sustancias. Una primera hipótesis para explicar estos cambios a largo plazo se basa en los cambios moleculares que se observan de una manera similar tanto en los procesos de aprendizaje como durante el desarrollo de los fenómenos adictivos y en los trastornos de ansiedad (Ungless et al., 2001). En realidad, ambos tipos de procesos son modulados por los mismos mecanismos neuroquímicos y comparten sistemas de señalización intracelular.

Como hemos apuntado anteriormente, los cambios conductuales secundarios al aprendizaje son consecuencia de alteraciones plásticas a nivel sináptico, cuyos mecanismos reciben el nombre de potenciación a largo plazo (LTP) o depresión a largo plazo (LTD) (Nestler, 2002). Ambos mecanismos incluyen la participación de dos importantes sistemas de neurotransmisores, el glutamato y la DA, ampliamente distribuidos en diferentes regiones corticales, del sistema límbico, y de los ganglios basales y considerados clave en los procesos motivacionales, y en el aprendizaje y la memoria. La actividad coordinada de ambos sistemas de neurotransmisores, principalmente a través de receptores glutamatérgicos (AMPA y NMDA) y dopaminérgicos (D1 y D2), es necesaria para la inducción de señales intracelulares responsables de la fosforilación de proteínas y de la activación de la expresión

génica (Figura 4) y subsecuentemente de la síntesis de novo de proteínas responsables de modificaciones sinápticas. Se trata de un complejo proceso en cascada cuya consecuencia final es la remodelación transitoria o persistente de la red neuronal, con posibles consecuencias sobre la conducta (Kelley, 2004). En este sentido, la activación del factor de transcripción, CREB (cAMP response element-binding, Figura 4), se ha relacionado con procesos de memoria y aprendizaje (Bourtchuladze et al., 1994) y con la dependencia a opiáceos (Maldonado et al., 1996; Nestler, 2004; Valverde et al., 2004). A pesar de estos mecanismos neuroquímicos comunes, diferentes regiones cerebrales están implicadas en ambos tipos de procesos. Mientras el hipocampo es una estructura crucial para el aprendizaje, el sistema mesolímbico representa el principal sustrato anatómico de los fenómenos de refuerzo asociados al consumo de drogas. Sin embargo, existe una convergencia sustancial entre los circuitos neuronales implicados en uno y otro proceso. Así, la actividad del sistema mesolímbico permite reforzar las memorias codificadas en el hipocampo, en particular aquellas que tienen un contenido emocional (Nestler, 2002, , 2004).

Estos mecanismos son los encargados de optimizar las respuestas de los organismos para garantizar su supervivencia. Así, aprender donde hay comida o donde se encuentra un peligro, son procesos altamente adaptativos que permiten modular el comportamiento en función de los requerimientos del entorno. En el caso de las drogas de abuso o en los trastornos de ansiedad, estos cambios plásticos se vuelven disfuncionales, y por consiguiente responsables de conductas maladaptativas.





**Figura 4. Algunos de los eventos celulares involucrados en la regulación de CREB.** Los neurotransmisores y las neurotrofinas actúan sobre los receptores de membrana (Ej.: TrkB, AMPA, NMDA y receptores asociados a proteínas G), activando cascadas de señalización intracelulares que culminan en la fosforilación de CREB. La fosforilación de CREB en los residuos de serina 133, activa la transcripción de genes. Las vías representadas en la figura, muestran de forma simplificada muchas de las vías que se producen en la señalización intracelular. Como ejemplo, podría esperarse que la activación de un receptor unido a una proteína G<sub>i</sub>, redujera la fosforilación de CREB a través de la inhibición del AC, sin embargo se ha observado que tales acontecimientos inducen la fosforilación de CREB en algunos tipos celulares, posiblemente a través de la activación de cascadas de MAPK. Las proteínas que se forman como consecuencia de la activación de genes a través de CREB, se muestran en color verde. La expresión de estos genes es exclusiva de un área cerebral específica, de manera que estos genes no tienen porque ser los mismos que en otras zonas. Las flechas negras significan la activación y las grises la inhibición. **Obtenido de Nestler et al., 2005**

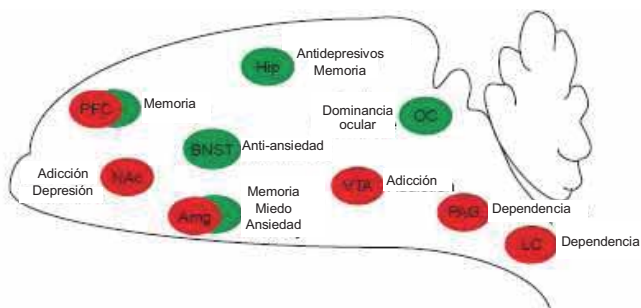
Estudios recientes han permitido un notable avance en el conocimiento del sustrato biológico responsable de los efectos reforzadores y aversivos de las drogas de abuso, mostrando la existencia de mecanismos neuroquímicos, moleculares y neuroanatómicos comunes a la adicción a distintos tipos de drogas. Cada uno de los fenómenos asociados al abuso de sustancias (ver más abajo), posee su propio perfil. Así, la dependencia física a opiáceos se origina como consecuencia de una serie de cambios adaptativos que se producen tanto a nivel del propio sistema opioide endógeno como sobre otros sistemas como el sistema noradrenérgico. Por otra parte, la adicción a las drogas se produce a través de la activación del sistema de recompensa cuya persistencia, incluyendo el riesgo de recaída tras largos periodos de abstinencia, es consecuencia de la persistencia de memorias asociativas en regiones cerebrales que reciben inervación dopaminérgica (Frenois et al., 2005; Robinson et al., 2005). El sistema mesolímbico ha sido identificado como el sustrato neurobiológico común para los efectos reforzadores inducidos por todas las drogas de abuso, que incrementan los niveles de DA en el NAc, cuya fuente de DA es la VTA localizada en el mesencéfalo. Sin embargo, la DA no solamente está implicada en el refuerzo, como se creía inicialmente (Robinson et al., 1993). De hecho, animales mutantes carentes de DA muestran respuestas hedónicas pero no son capaces de utilizar la sensación de placer como incentivo para actuar en busca del estímulo compensatorio (Berridge and Robinson, 1998; Robinson et al., 2005). Así, aunque las propiedades reforzadores de las drogas adictivas son importantes en la adquisición de la conducta de autoadministración de

la droga, no son suficientes para el desarrollo de procesos tales como el consumo o la búsqueda compulsiva de ésta. Estas conductas tienen como objetivo evitar el malestar y el estado de ansiedad provocado por el síndrome de abstinencia, por lo que se cree que son propiciadas por el miedo a sufrir dicho síndrome (Mucha et al., 1986; Koob et al., 1989; Koob, 1996). Sin embargo, recientemente ha aparecido una teoría alternativa en la que el síndrome de abstinencia se considera análogo a otros incentivos naturales. Es decir, tanto el síndrome de abstinencia como por ejemplo, la sensación de hambre, incrementan la búsqueda y el consumo compulsivo de la comida/droga tras un período de abstinencia, incrementando el valor incentivo de la comida/droga y convirtiéndose así en conductas predominantes en el individuo (Hutcheson et al., 2001). En individuos adictos, el simple hecho de recordar el síndrome de abstinencia, produce un incremento de la motivación por el consumo y la búsqueda de la droga, que da lugar a la recaída. Estas memorias pueden ser reactivadas mediante señales contextuales o en situaciones relacionadas con el síndrome de abstinencia o la recaída (Childress et al., 1993), y son moduladas por proyecciones dopaminérgicas de la VTA a la amígdala (Nader and LeDoux, 1999). Es por ello, que la DA se relaciona con la reactivación de memorias asociadas a estímulos aversivos, incrementando la actividad glutamatérgica de la BLA y incentivando finalmente la búsqueda compulsiva del estímulo recompensante (Frenois et al., 2005). Por otra parte, estudios recientes, han demostrado que la porción central del NAc está relacionada con respuestas conductuales de tipo instrumental. Éstas implican el aprendizaje, la asociación o la contingencia entre el estímulo de reforzamiento y la respuesta conductual. Estudios farmacológicos han demostrado que la expresión de este tipo de aprendizaje es alterado por antagonistas del receptor NMDA, como AP-5 (Rodríguez-Borrero et al., 2006), cuya infusión local en la porción central del NAc, altera la adquisición de este tipo de aprendizaje, pero administrada en la región de la corteza del NAc, no previene el desarrollo y la expresión de esta conducta motivacional. Por tanto, diversos autores proponen que el aprendizaje de tipo instrumental en la porción central del NAc es alterado mediante la manipulación del sistema glutamatérgico, mediado por receptores NMDA.

Al igual que sucede en los trastornos adictivos, los trastornos de ansiedad son consecuencia de la disregulación de la respuesta del sistema del miedo, por lo que

individuos con trastornos de ansiedad tienden al abuso de drogas con el fin de paliar este estado emocional. Además, uno de los componentes principales que posibilitan el mantenimiento del trastorno es la persistencia de memorias asociadas a estímulos aversivos. Estas memorias asociativas se caracterizan por su dependencia a procesos de plasticidad neuronal, importantes en el mantenimiento de conductas aprendidas. En la mayor parte de los casos los procesos de plasticidad sináptica desembocan en modificaciones estructurales a nivel dendrítico, siendo las estructuras más susceptibles de modificación las espinas dendríticas. Aunque todavía se conjetura la relación entre estas alteraciones en la morfología dendrítica y la conducta asociada, hay estudios que implican los factores neurotróficos por su papel en el desarrollo del sistema nervioso, y por estar implicados en la plasticidad sináptica del sistema nervioso adulto, a través de su función en el crecimiento, la supervivencia, y la diferenciación neuronal (Nestler, 2001). La síntesis de estos factores neurotróficos viene regulada en diferentes procesos por la actividad del factor de transcripción CREB (Figura 5). Desde hace años se conoce la participación de CREB en diferentes funciones fisiológicas y alteraciones en esta proteína se han relacionado con numerosos trastornos del SNC (Tanis et al., 2008). Así, CREB facilita el aprendizaje y la memoria en la PFC, hipocampo y amígdala; y regula las conductas adictivas en el LC y NAc (Lonze and Ginty, 2002; Carlezon et al., 2005). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la expresión de Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), un gen de expresión temprana (IEG, immediate early gene), implicado en plasticidad sináptica, modula el desarrollo de los síntomas de abstinencia al alcohol y la tendencia a beber alcohol en animales de laboratorio, probablemente como consecuencia de cambios en la microestructura neuronal de la amígdala (Pandey et al., 2008). De hecho, los efectos ansiolíticos de la administración aguda de alcohol se asocian a un incremento de BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) y TrkB (receptor de alta afinidad para BDNF) e incrementos de expresión de Arc mientras que el efecto ansiogénico de la abstinencia, producen el efecto opuesto. Estos cambios se acompañan de un incremento de la densidad de espinas dendríticas en CeA y medial (MeA), pero no en la BLA de ratas, y afectan a la comunicación interneuronal, alterando el comportamiento del animal. En periodos de abstinencia, los animales que han sido expuestos crónicamente al alcohol, muestran incrementos de ansiedad, acompañados de una reducción de los niveles de BDNF y Arc, así

como del número de espinas dendríticas en la amígdala. La infusión de BDNF en CeA normaliza estos parámetros y protege frente a la ansiedad propia del síndrome de abstinencia. Ello sugiere que la señalización a través de BDNF–Arc en la amígdala podría ser un elemento clave en la comorbilidad entre ansiedad y abuso de sustancias.



**Figura 5. Activación de CREB en regiones cerebrales implicadas en trastornos del SNC.** En verde se muestran los efectos beneficiosos de CREB y en rojo los perjudiciales. Obtenido de Carlezon et al., 2005

#### 4. FENOMENOLOGÍA DE LA PATOLOGÍA DUAL

Los diferentes procesos que participan en los fenómenos adictivos son complejos tanto desde un punto de vista neurobiológico como comportamental y dan lugar a toda una serie de manifestaciones que incluyen fenómenos tales como la tolerancia, dependencia, sensibilización y búsqueda compulsiva o “craving”. Los fenómenos de tolerancia y la dependencia física corresponden a adaptaciones desarrolladas en respuesta a una exposición prolongada a determinadas drogas, pero no están directamente relacionadas con las propiedades adictivas. Existen distintos modelos que permiten evaluar la tolerancia y la dependencia física en el animal de experimentación. La cuantificación de las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia que aparece tras la interrupción de la administración repetida de la droga permite determinar la severidad de la dependencia física. Dicho síndrome de abstinencia aparece tan solo con determinadas drogas de abuso, como los opiáceos, y es un proceso diferente de las manifestaciones motivacionales negativas que aparecen tras la abstinencia a cualquier droga de abuso. La tolerancia puede determinarse evaluando la disminución de los efectos farmacológicos de una droga tras su administración repetida (Rounsaville et al., 1986). Una característica común de las diferentes drogas de abuso es su capacidad para inducir un comportamiento de búsqueda compulsiva “craving”, en el que

predomina la expectativa del adicto hacia los efectos motivacionales positivos que presenta la droga. Durante la administración repetida de la droga puede observarse el fenómeno de sensibilización a determinadas acciones farmacológicas que se manifiestan en modelos experimentales por un incremento progresivo de los efectos locomotores de la droga (Robinson and Berridge, 1993).

De interés en la patología dual, la adicción se caracteriza por un comportamiento compulsivo de búsqueda y consumo de ésta, que continua incluso bajo condiciones adversas. Estas conductas compulsivas son la respuesta a memorias asociadas a estímulos aversivos, tales como el miedo a la propia abstinencia. Probablemente, por ello, las personas con trastornos de ansiedad son más susceptibles al consumo de drogas, ya que los trastornos de ansiedad tienen como base la existencia de memorias permanentes frente a miedos irracionales, y cuya respuesta emocional podría ser similar a la de la abstinencia (Vgontzas et al., 1995). Sin embargo, el término de adicción se considera diferente al de dependencia física, el cual se refiere solamente a las adaptaciones del organismo frente al uso crónico de una droga, como medida para compensar los efectos de ésta. El cese de la droga provoca el síndrome de abstinencia, caracterizado por un malestar generalizado (disforia). Este malestar es comparable al de un ataque de pánico, por lo que la sintomatología de un trastorno de ansiedad, y más específicamente, la de un trastorno de pánico sería parecida a la observada durante una abstinencia, y como consecuencia el patrón de activación de regiones cerebrales implicadas en éstos, sería el mismo (Petracca et al., 1991; McDougale et al., 1994). Otro fenómeno relacionado con el consumo de drogas es la tolerancia, definida como una disminución de los efectos de la droga después de consumir una dosis constante de ésta. También se puede definir como la necesidad de una dosis mayor para obtener los mismos efectos. Todos estos fenómenos son la expresión conductual de los cambios moleculares y estructurales de diferentes regiones cerebrales, producidos como consecuencia del consumo repetido de una droga.

Tanto la impulsividad como la búsqueda de sensaciones son dos rasgos de personalidad clásicamente asociados al consumo de sustancias. Aunque con una base genética común, se trata de dos rasgos diferenciados con distinta influencia en el inicio y mantenimiento del consumo. En estudios con gemelos, estos rasgos de

personalidad han evidenciado su heredabilidad. Estos rasgos junto con las conductas externalizadoras (desordenes de conducta y personalidad antisocial) son fenotipos intermedios ligados a polimorfismos en el gen DRD2, DRD4, SLC6A3 (transportador de DA) (Congdon et al., 2008) y MAOA ( Monoamine oxidase A , Huang et al., 2004). Por otra parte, los estudios de ligamiento en el promotor del gen del trasportador de serotonina (HTTLPR) junto con estudios de neuroimagen indican una profunda interacción genes-ambiente de tal forma que los alelos cortos (S) contribuyen significativamente al riesgo a la dependencia severa al alcohol, la conducta antisocial y tentativas de suicidio (Preuss et al., 2000). En este caso el consumo de drogas puede ser dependiente de la exposición al estrés y a cambios en la respuesta emocional en la amígdala.

#### 4.1. Sistema opioide y ansiedad

El consumo de drogas como recurso para paliar estados de ansiedad, es una práctica habitual en la sociedad actual. De entre todas las drogas los opiáceos son considerados entre los más adictivos. Los opiáceos son principios activos de la planta del opio, y de entre los más conocidos encontramos la morfina. La morfina puede simular los efectos de las endorfinas (morfina endógena) actuando sobre receptores del sistema opioide endógeno (Figura 6), preferentemente sobre los

receptores mu ( $\mu$ ). Existen tres tipos de receptores opioides:  $\mu$ , delta ( $\delta$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Los receptores  $\mu$ -opioides (MOR) no solamente juegan un papel importante en la adicción sino que también intervienen en los efectos analgésicos de la morfina. Los receptores  $\kappa$ -opioides (KOR) intervienen en la disforia y la analgesia, mientras que los receptores  $\delta$ -opioides (DOR) requieren, en la mayoría de los

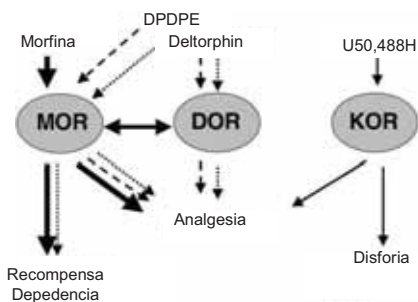


Figura 6. Funciones de los receptores opioides. Obtenido de Brigitte L. Kieffer., 2002

casos, de la acción conjunta de los receptores MOR y KOR para producir analgesia, sin ninguna otra función conocida (Kieffer and Gaveriaux-Ruff, 2002). La acción de opioides exógenos (morfina) sobre estos receptores, puede dar lugar a la internalización de éstos, o a modificaciones post-traslacionales o biosintéticas. De

hecho, la administración crónica de morfina disminuye los niveles de MOR en algunas regiones cerebrales (Bernstein and Welch, 1998), con lo que podrían estar modulando respuestas a estímulos aversivos, influyendo en el desarrollo de trastornos de ansiedad (Kudryavtseva et al., 2004). Otros elementos comunes a los trastornos de ansiedad y el sistema opioide son un incremento de la activación del LC (ver apartado 2.1.).

## **5. GENES CANDIDATOS PARA EXPLICAR LA PATOLOGÍA DUAL**

Se piensa que los procesos neurobiológicos que subyacen a la adicción, la recompensa, las funciones cognitivas ejecutivas, el estrés o la ansiedad se solapan sustancialmente con aquellos procesos que están implicados en desórdenes psiquiátricos, y por ello se supone que existen en común factores genéticos. Ambas enfermedades se heredan como enfermedades complejas, sin un patrón obvio de transmisión Mendeliana, es decir son poligénicas, apareciendo la vulnerabilidad por el impacto funcional simultáneo de variantes alélicas en diferentes genes (Uhl et al., 2008). Existen varias familias de genes que podrían explicar la comorbilidad entre los trastornos de ansiedad y el abuso de drogas. Los estudios realizados en animales de experimentación con drogas de abuso proponen varios genes candidatos de susceptibilidad tales como BDNF, el receptor de serotonina 5HT1B, el receptor GABAA, el neuropéptido Y (NPY), el receptor D2,  $\Delta$ fosB (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B), CREB, GAD1 (glutamato descarboxilasa tipo 1), COMT (catechol-O-methyl transferase) y varios receptores de glutamato. También procedente de estudios animales se han identificado ciertos genes importantes en enfermedades psiquiátricas, como por ejemplo el gen de la neuregulina 1 o de su receptor ErbB4 (Epidermal growth factor receptor type 4, Talmage, 2008), y varios de los mencionados para los trastornos de abuso de sustancias, como potenciales candidatos en la patología psiquiátrica (Itoh et al., 2004; Zai et al., 2005; Smith et al., 2008; Yao et al., 2008). En los últimos años, el uso de fenotipos intermedios y/o endofenotipos (rasgos biológicos medibles y heredables que están asociados con fenotipos conductuales) como marcadores biológicos intermedios, ha permitido incrementar el poder de los estudios de asociación genética para las enfermedades psiquiátricas poligénicas. En este sentido y como ejemplo, la asociación del haplotipo SLC6A4 (gen del transportador

de serotonina), presentaba muy modesto efecto de asociación con la personalidad ansiosa o las conductas de miedo (Shaikh et al., 2008), pero la utilización de la respuesta funcional de la amígdala a un estímulo de miedo mediante fMRI, como endofenotipo para la ansiedad o la conducta de miedo, incrementó la correlación en más de diez veces (Hariri and Weinberger, 2003). Por otra parte, los polimorfismos en el gen COMT alelo Val158 esta asociado a impulsividad y vulnerabilidad a la adicción (Mattay et al., 2003). Sin embargo, el alelo Met158 es mas común en la población adicta en la cual la ansiedad es la causa predisponente (Kunugi et al., 1997).

En esta Tesis Doctoral hemos centrado nuestro esfuerzo en determinar el posible papel de un sistema de factores neurotróficos, el sistema NT-3 (neurotrofina 3)/TrkC (receptor de alta afinidad para NT-3, Lamballe et al., 1991; McGregor et al., 1994) y de alteraciones en la funcionalidad del sistema colinérgico a través de cambios en un cluster de nAChRs, recientemente relacionado con la dependencia nicotínica, como potenciales candidatos para explicar la patología dual. Además, ambas familias de genes podrían verse alterados por factores predisponentes a la patología dual, tales como el estrés crónico, o una situación traumática.

Además de su papel en los mecanismos de adaptación, estos factores neurotróficos son de mayor relevancia durante el neurodesarrollo, ya que durante esta etapa los cambios en plasticidad sináptica son mucho más abundantes. Así, los factores neurotróficos jugarían un papel dual a/ en el desarrollo, en la creación de un “cerebro ansioso” y por lo tanto susceptible a la adicción a las drogas, y b/ en la neuroadaptación que subyace tanto a las alteraciones de la extinción en los trastornos de ansiedad como en las subyacentes a la adaptación neuronal que define la adicción a drogas y las conductas asociadas. Por otra parte las alteraciones producidas en los sistemas de neurotransmisión, se considerarían como parte del componente funcional de la patología dual. Así, genes implicados en la formación de canales iónicos, responsables de la liberación de neurotransmisores, tales como nAChRs, serían candidatos, junto con los factores neurotróficos, para explicar la patología dual. En esta introducción nos centramos en las evidencias relacionadas con estos aspectos.



## 5.1. HIPÓTESIS NEUROTRÓFICA: Neurotrofinas y sus receptores

A la vista de los datos presentados en los apartados anteriores, en los que claramente existe un porcentaje alto de la población psiquiátrica con patología dual, que además aparece un cierto grado de correspondencia de genes entre la adicción y los trastornos de ansiedad y que en ambos tipos de enfermedades los pacientes no son capaces de reconocer su enfermedad, es de gran interés estudiar posibles genes con los rasgos fundamentales de ambas patologías.

Una de las familias de genes candidatos para explicar la formación de este “cerebro ansioso” serían las neurotrofinas, tanto por su función durante el neurodesarrollo como por su papel en la neuroplasticidad en el adulto. Los factores neurotróficos constituyen una familia de proteínas que se expresan durante el neurodesarrollo pero la actividad neuronal también tiene un importante efecto sobre los niveles de expresión de neurotrofinas, por lo que se consideran cruciales en la plasticidad sináptica (Wang and Poo, 1997). Estas proteínas actúan a través de su unión con dos clases de receptores transmembrana diferentes (los receptores tirosina quinasas Trk y el receptor p75), responsables de la activación de cascadas de señalización intracelular, importantes en muchos de los aspectos de la función y la supervivencia neuronal. El equilibrio de niveles de expresión de neurotrofinas y sus receptores determinan el balance entre la supervivencia y la apoptosis celular durante el neurodesarrollo, por lo que alteraciones en sus niveles durante esta etapa podrían tener consecuencias estructurales en el SNC adulto. Además, las neurotrofinas y sus receptores también juegan un papel importante en el SNC adulto, en la supervivencia neuronal, en el mantenimiento del fenotipo neuronal regulando las conexiones sinápticas, en la plasticidad sináptica dependiente de actividad, y en la neurotransmisión. Su implicación en la plasticidad neuronal, puede mediar cambios en las conexiones sinápticas asociadas a memoria y aprendizaje en situación fisiológica y en patologías relacionadas con la interpretación distorsionada de señales ambientales, como el trastorno de ansiedad o pánico, que conllevan la alteración de los procesos de plasticidad neuronal. Por todo ello, se ha propuesto que alteraciones en los niveles de estas proteínas podrían ser factores etiopatogénicos relacionadas con trastornos neuropsiquiátricos y abuso de sustancias (Chao et al., 2006).

En este sentido, la BDNF se ha visto implicada en memoria y aprendizaje, depresión, estrés y adicción a drogas (Pandey et al., 2006) y GDNF se ha visto implicado en respuestas conductuales derivadas de la administración crónica de morfina, modificando los niveles de DA (Airavaara et al., 2007). BDNF junto con NT-3 juegan un papel importante en la regulación de la función noradrenérgica del LC en respuesta a opiáceos (Akbarian et al., 2001; Hatami et al., 2007). En concreto NT-3 se ha relacionado con la supervivencia y trofismo de neuronas noradrenérgicas en el adulto (Brodski et al., 2000), pero su efecto en el neurodesarrollo es menos conocido (Hapner et al., 2006). En el SNC, el receptor de alta afinidad para la NT-3, TrkC, se expresa abundantemente en corteza cerebral, hipocampo, tálamo e hipotálamo y el LC (Merlio et al., 1992). Nuestros resultados previos, en ratones con sobreexpresión de la isoforma salvaje de TrkC sugieren que cambios en los niveles de expresión de éste modulan el desarrollo y la funcionalidad de determinadas áreas cerebrales (Dierssen et al., 2006) y demuestran un fenotipo ansioso y una mayor reacción de pánico en el ratón con sobreexpresión de TrkC. Sin embargo, experimentos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la sobreexpresión de TrkC podría ejercer también un efecto trófico en otras áreas cerebrales como el hipocampo y la corteza cerebral (Sahun et al., 2007).

### **5.1.1. Neurotrofinas en el LC**

La relación causal y/o mecánica entre neurotrofinas y malfunción del sistema nervioso en los trastornos de ansiedad podría concretarse en determinadas estructuras del circuito del miedo, o podría derivar de una afectación más general en procesos celulares subyacentes a la neuroplasticidad. Una de las estructuras que podrían ser clave para explicar esta interacción es el LC.

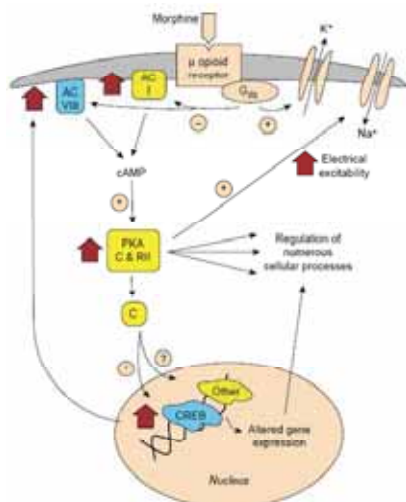
Como ya se ha comentado anteriormente, alteraciones en la actividad de este núcleo se relacionan con trastornos psiquiátricos, por su papel sobre procesos cognitivos y afectivos. La activación del LC produce un incremento de la liberación de NA en muchas regiones cerebrales, tales como la amígdala, el hipotálamo y el propio LC encargadas de la expresión de emociones como el miedo o la ansiedad (Tanaka et al., 2000) y también de los signos de la abstinencia a la morfina (Van

Bockstaele et al., 2001; Holmes and Picciotto, 2006). Así, el LC se ha visto implicado en los aspectos físicos de la adicción a opiáceos, es decir, en la dependencia física y en el síndrome de abstinencia (Rasmussen et al., 1990; Ivanov and Aston-Jones, 2001), pero también en los ataques de pánico (Priolo et al., 1991; Gorman et al., 2000; Protopopescu et al., 2006) y en otros trastornos de ansiedad (Bremner et al., 1996; Tanaka et al., 2000) por lo que muy posiblemente sea una región clave en la comorbilidad de ambos procesos.

Aunque tras un consumo agudo de opiáceos, se produce una disminución de la actividad del LC, después de un consumo crónico, y en condiciones de abstinencia, se produce un incremento de la actividad de éste núcleo como respuesta homeostática o compensatoria. En el caso de los trastornos de ansiedad, y más concretamente durante un ataque de pánico, se observa un incremento de la actividad de este núcleo a través de la activación de la CeA (Gorman et al., 2000) donde se produce una desinhibición de neuronas GABAérgicas. Esta desinhibición GABAérgica en la amígdala es responsable del incremento de la actividad del LC directamente o a través de la desinhibición de núcleos como el hipotálamo o la sustancia gris periacueductal (PAG), los cuales proyectan hacia el LC (Aston-Jones et al., 1991). Por otro lado, un incremento de la actividad noradrenérgica en la BLA es responsable de una mayor eficiencia en la adquisición de memorias asociativas incrementando así la respuesta amigdalina después de una reexposición al estímulo aversivo (Przybyslawski et al., 1999). Ello explicaría la eficacia de los inhibidores de la recaptación de serotonina para paliar los síntomas de un ataque de pánico, ya que éstos incrementan los niveles de serotonina, responsables de bloquear la liberación de NA a través de la inhibición del LC, el hipotálamo, y la amígdala, en este último caso, a través de inhibir las aferencias excitatorias tálamicas y de la corteza sensorial hacia la LA (Gorman et al., 2000; Kawahara et al., 2007).

En el caso del abuso de opiáceos, éstos actúan sobre los receptores opioides del LC produciendo la activación de canales de potasio a través de las proteínas Go, y disminuyendo la actividad AC a través de Gi. La consiguiente disminución de los niveles de cAMP y de la fosforilación de proteínas quinasas A (PKA) serían responsables de la activación de los canales catiónicos no específicos, y de genes

implicados en los cambios producidos a largo plazo, asociados a la adicción. Cuando el consumo de opiáceos se cronifica, las neuronas del LC desarrollan tolerancia farmacodinámica al efecto inhibitorio agudo, retornando la actividad neuronal, a los niveles anteriores al consumo crónico. El cese de éste produce un incremento de la actividad del LC superior a la del pre-tratamiento con opiáceos que se ha relacionado con conductas asociadas al síndrome de abstinencia (Rasmussen et al., 1990; Maldonado, 1997), y depende de la activación glutamatérgica de neuronas del LC, mediada por un incremento del cAMP de neuronas sensoriales primarias (Tokuyama et al., 1998) como consecuencia del incremento de dos subunidades de AC (tipo I y VIII). El incremento de la subunidad VIII parece estar regulado por la activación o fosforilación de CREB, mientras que el incremento de la subunidad I y de las subunidades de la PKA parecen estar regulados por mecanismos diferentes (Figura 7). Estos fenómenos, junto con el



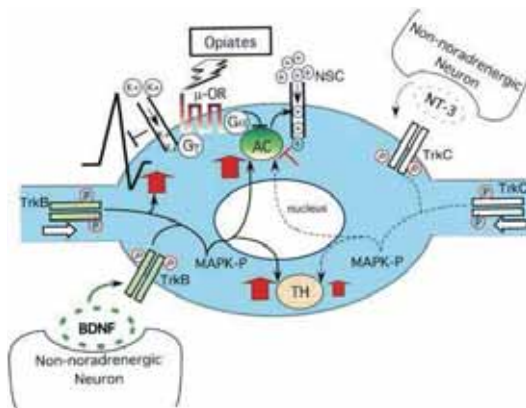
**Figura 7. Acción de los opiáceos en el Locus coeruleus.** Las flechas hacia arriba resumen el efecto de la morfina crónica. Adaptado de Nestler et al., 1997

incremento de la expresión de diferentes genes como la tirosina hidroxilasa (TH), el enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, y/o factores neurotróficos encargados de modificaciones estructurales, serían responsables de compensar el efecto inhibitorio producido por la acción aguda de los opiáceos, pero a la vez, de contribuir a la dependencia física, incluyendo el síndrome de abstinencia una vez se produce el cese repentino de la droga. De hecho, las neurotrofinas BDNF y NT-3 son esenciales en las adaptaciones que se producen en el sistema noradrenérgico tras un consumo crónico de opiáceos (Figura 8), ya que

BDNF incrementa la actividad de la vía del cAMP, la síntesis de TH, y restaura la actividad neuronal (Akbarian et al., 2002), y NT-3 incrementa la síntesis de TH, alterando a su vez la actividad eléctrica del LC (Akbarian et al., 2001). Sin embargo BDNF y NT-3 no se expresan en el LC, por lo que su participación en las adaptaciones producidas por el consumo crónico de opiáceos, viene dada por la liberación de estas neurotrofinas desde neuronas no noradrenérgicas, y su unión a

los receptores TrkB y TrkC en el LC, donde su expresión es abundante (King et al., 1999).

Es por todo ello que los factores neurotróficos y/o sus receptores, podrían ser genes candidatos a la comorbilidad entre ambos trastornos. Así una disregulación de éstos podría alterar el circuito del miedo a través de cambios plásticos permanentes, y a la vez podría afectar a la respuesta adaptativa del LC frente al consumo de opiáceos.



**Figura 8. Papel de las neurotrofinas en las adaptaciones del LC inducidas por el consumo crónico de opiáceos.** BDNF y NT-3 son liberados por neuronas no noradrenérgicas activando los receptores TrkB y TrkC. Obtenido de Akbarian et al., 2002

## 5.2. HIPÓTESIS FUNCIONAL: Sistema Nicotínico Colinérgico

Tanto en los trastornos de ansiedad como en los trastornos adictivos las alteraciones en los niveles y/o la funcionalidad de algunos sistemas de neurotransmisión son observación común. Así pues, la comorbilidad de ambas enfermedades podría residir en la manifestación de una disregulación de diversas vías funcionales comunes. El circuito cerebral responsable tanto de conductas de miedo o ansiedad como adictivas, se encuentra regulado por una amplia variedad de neurotransmisores, que incluyen los neuropéptidos transmisores CRH, sustancia P y NPY, los transmisores monoaminérgicos NA, 5HT y DA y los transmisores aminoacídicos GABA y glutamato. Como se ha comentado anteriormente, bajo situaciones de estrés o durante el síndrome de abstinencia se observan incrementos en los niveles de NA en regiones cerebrales como la amígdala, el LC, el tálamo, el hipotálamo y los ganglios basales, mientras que incrementos en la liberación de GABA se han relacionado con efectos ansiolíticos (Shekhar, 2003). Por otra parte se han observado incrementos de DA en el NAc tras un consumo de

drogas (Ferrari et al., 2003), aunque el incremento dopaminérgico no es exclusivo de estímulos placenteros, sino que se ha observado también frente a estímulos aversivos (Adinoff, 2004). Un ejemplo, es el caso del miedo condicionado, durante el cual se observan alteraciones dopaminérgicas en el NAc y regiones cerebrales relacionadas con éste, como la VTA y la PFC. A diferencia de la nicotina, el miedo condicionado no implica una recompensa, sino que incluye aspectos de memoria y aprendizaje. No obstante, los mecanismos que subyacen a la recompensa-adicción contienen parte de memoria y aprendizaje, y parte del aprendizaje se produce como consecuencia de recompensas.

Un buen candidato a alterar la función de los circuitos cerebrales del miedo pero también los niveles de neurotransmisores y sus funciones, es la nicotina. Su capacidad de influir en múltiples funciones viene dada por la presencia de nAChRs en todo el SNC, incluso en neuronas no colinérgicas. La activación de estos receptores, incrementa la liberación de neurotransmisores, modifica la excitabilidad neuronal, e influye en la plasticidad sináptica. Así pues, estos receptores ejercen un papel sobre el sistema de recompensa, el aprendizaje, y la cognición, proponiendo a los nAChRs como genes candidatos al desarrollo de enfermedades, tales como trastornos de ansiedad o abuso de sustancias. Los nAChRs forman parte de una super-familia de receptores de canales iónicos, que comprenden una amplia variedad de subtipos (Figura 9), formados por combinaciones de 5 subunidades ( $\alpha\beta$ ), dando lugar a heterómeros ( $\alpha 2$ – $\alpha 6$  y  $\beta 2$ – $\beta 4$ ) o homómeros ( $\alpha 7$ – $\alpha 10$ ). Aunque cada subunidad presenta características funcionales y farmacológicas diferentes, todas presentan los mismos estados funcionales frente a agonistas. La diversidad de los nAChRs y su localización tanto pre-sináptica como post-sináptica, somal, dendrítica o axonal, contribuyen a la amplia variedad de funciones que ejercen en el SNC.

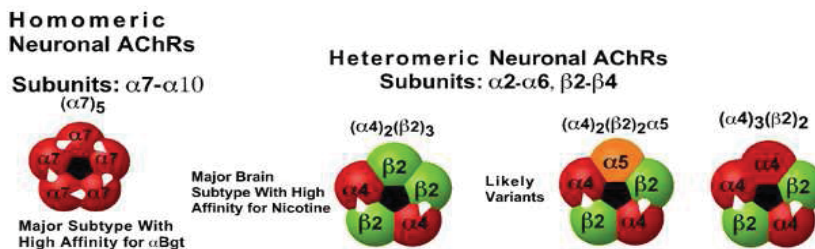


Figura 9. nAChRs del SNC. Imagen adaptada de <http://www.med.upenn.edu/nscience.html>

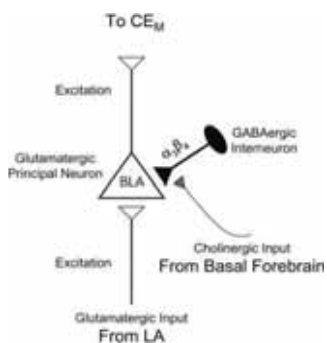
### **5.2.1. Nicotina y ansiedad**

El consumo abusivo de tabaco es un hábito muy frecuente entre personas con trastornos de ansiedad, stress, depresión, etc. De hecho, el 60% de personas que consumen tabaco presentan algún tipo de trastorno afectivo, lo que sugiere que la nicotina puede actuar mejorando los síntomas tanto de la ansiedad como de la depresión (Williams and Ziedonis, 2004). Fumar se considera un factor de riesgo para la aparición de ataques de pánico, y además también se ha observado que individuos con trastornos de pánico consumen una cantidad elevada de tabaco (Pohl et al., 1992; Amering et al., 1999). Además, el consumo exagerado de nicotina en adolescentes se ha asociado con un alto riesgo de padecer trastornos de pánico, trastornos de ansiedad generalizada, y agorafobia (Johnson et al., 2000). Sin embargo, la nicotina es también una sustancia adictiva, que incrementa la liberación de DA desde proyecciones mesolímbicas hacia el NAc, iniciando de esta manera conductas asociadas a la recompensa. Esta comorbilidad se caracteriza por alteraciones en los niveles de neurotransmisores, atribuibles a la activación de nAChRs (Leonard and Bertrand, 2001).

Es observación frecuente que los fumadores se refieran a una disminución de los síntomas de ansiedad mediante el consumo de tabaco. Sin embargo, el uso crónico de nicotina en estudios con animales se ha relacionado con un incremento de la ansiedad (Irvine et al., 2001), aunque estudios con animales y humanos sugieren que en ciertas condiciones, la nicotina administrada de forma aguda actúa como un ansiolítico o un antidepresivo, pero tras el uso crónico, siempre se observa un incremento de la ansiedad (Picciotto et al., 2002). En este sentido se ha postulado que el incremento de la ansiedad y el estrés en fumadores es debido al uso crónico de la nicotina y no a la abstinencia de ésta, y que interacciones serotoninérgicas con la nicotina son las responsables de estos efectos (Irvine et al., 2001; Picciotto et al., 2002). Los estudios realizados en ratones con mutaciones en nAChRs, sugieren una conexión entre estos receptores y los trastornos de ansiedad, de forma que ratones con mutaciones en la subunidad  $\alpha 4$  presentan un incremento de la ansiedad (Ross et al., 2000) mientras que mutaciones en las subunidades  $\alpha 7$  (Paylor et al., 1998),  $\beta 3$  (Booker et al., 2007) o  $\beta 4$  (Salas et al., 2003a) producen una disminución de ésta.

### 5.2.2. El papel de la nicotina en el sistema de recompensa y el aprendizaje condicionado

La nicotina ejerce una fuerte influencia sobre los niveles de neurotransmisores en diferentes regiones cerebrales, entre las que se encuentran el NAc (Sziraki et al., 2002), la VTA (Sziraki et al., 2002) y la amígdala (Shearman et al., 2005), áreas asociadas al sistema de recompensa y al aprendizaje. De hecho, el sistema colinérgico juega un papel muy importante en el sistema de recompensa y el aprendizaje, dos procesos interconectados, pero dependientes de mecanismos neuroquímicos diferentes (Lajtha, 2007). La nicotina podría influir en ambos procesos a través de su acción sobre la VTA, liberando DA, directamente a través de nAChRs somatodendríticos (principalmente  $\alpha 4\beta 2$ ) que enseguida se desensibilizan (Pidoplichko et al., 1997), o indirectamente mediante la desensibilización de neuronas GABAérgicas de la VTA o estimulando los receptores de glutamato de esta región (Schilstrom et al., 1998). La estimulación de los receptores de glutamato se produce mediante la activación de nAChRs pre-sinápticos  $\alpha 7$  situados en aferencias glutamatérgicas de la VTA (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004), provocando cambios plásticos similares a los observados en otras regiones cerebrales, como por ejemplo en la amígdala durante el aprendizaje y la memoria asociativa. De hecho, el aprendizaje y la memoria asociada a estímulos aversivos se encuentran regulados por proyecciones colinérgicas que recibe la BLA desde el núcleo basal magnocelular (Power and McGaugh, 2002). Además, se sabe que la activación de la BLA está modulada por nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 3\beta 4$  (Figura 10), localizados en las interneuronas GABAérgicas de la BLA (Zhu et al., 2005), sugiriendo que alteraciones en los niveles de estos receptores podrían afectar a la memoria asociada al miedo y por consiguiente participar en trastornos de ansiedad.



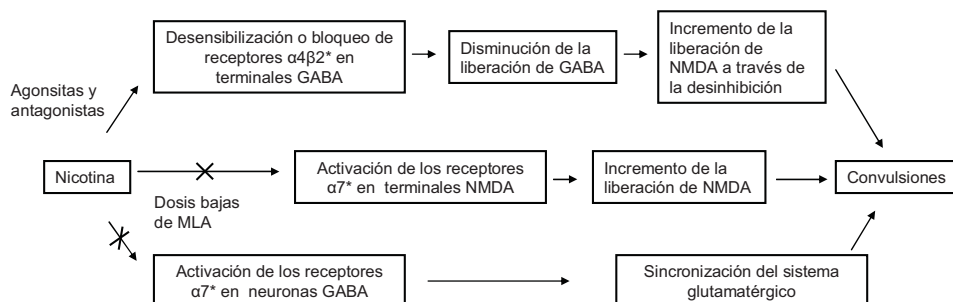
**Figura 10. Esquema del circuito neuronal del miedo regulado por AChRs.** La activación de las interneuronas GABAérgicas que contienen receptores  $\alpha 3\beta 4$  incrementa la inhibición de las neuronas de la BLA. **Obtenido de Zhu et al., 2005**



### **5.2.3. nAChRs y trastornos neuropsiquiátricos**

Los nAChRs, además de influir en trastornos de ansiedad, participan en otros trastornos psiquiátricos. Estas enfermedades se clasifican en dos categorías: una, en que la funcionalidad de los nAChRs está alterada, como el caso de la epilepsia (ADNFLE; Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy), y otra en que los niveles de los nAChRs están disminuidos, como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, o la enfermedad de Parkinson. Entre estas enfermedades, la epilepsia es la que parece tener una mayor comorbilidad con los trastornos de ansiedad, ya que la prevalencia de síntomas de ansiedad en pacientes con epilepsia es mayor que en el resto de la población, siendo el ataque de pánico el trastorno de ansiedad con mayor probabilidad de suceder como consecuencia de ataques epilépticos (Beyenburg et al., 2005). De hecho, se ha propuesto la existencia de un mecanismo fisiopatológico común, siendo la amígdala la estructura más importante encargada de la aparición de síntomas de ansiedad y de la activación de focos epilépticos en regiones del sistema límbico, en la corteza cingulada, en la OFC y en el lóbulo temporal epiléptico (Biraben et al., 2001). También se ha observado que la participación de receptores GABA<sub>A</sub> y de neurotransmisores como DA, NA y 5HT, tanto en los trastornos de ansiedad como en los ataques epilépticos, siguen un patrón funcional parecido (Beyenburg et al., 2001; Lydiard, 2003; Nemeroff, 2003). Así pues, la influencia de la nicotina sobre la excitabilidad neuronal se produciría principalmente a través del sistema GABAérgico, siendo estos efectos consecuencia de la desinhibición del sistema excitatorio mediada por la actividad de nAChRs. Sin embargo, muchos son los subtipos de nAChRs involucrados en este fenómeno. Los más abundantes en el cerebro son los formados por subunidades  $\alpha 4\beta 2$  y los formados por subunidades  $\alpha 7$  (Buisson and Bertrand, 2002). La activación de los receptores  $\alpha 7$  produce un incremento de la liberación de glutamato en terminales sinápticos (Damaj et al., 1999), dando lugar a la aparición de convulsiones. Aunque estos receptores también se encuentran en el soma y terminales nerviosos de interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Alkondon and Albuquerque, 2001), se postula que su activación induce una actividad sincronizada de estas neuronas, sincronizando a su vez, la actividad de neuronas piramidales del hipocampo y produciendo así ataques epilépticos (Dobelis et al., 2003). Sin embargo, la nicotina puede provocar convulsiones a través de la activación de otros subtipos de receptores como los

formados por  $\alpha\beta 2$  (Figura 11), cuya desensibilización en neuronas GABAérgicas, incrementa la liberación de glutamato por desinhibición (Dobelis et al., 2003).



**Figura 11. Esquema del circuito neuronal regulado por AChRs, encargado de ataques epilépticos.** La activación de diferentes subtipos neuronales produce convulsiones a través de diferentes vías. **Adaptado de Dobelis et al., 2003**

#### 5.2.4. Cluster genómico candidato a la comorbilidad entre trastornos adictivos, ansiedad y epilepsia

Las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$  y  $\alpha 3$  se encuentra localizadas en un mismo cluster genómico (Boulter et al., 1990; Duga et al., 2001), compartiendo elementos reguladores de la expresión (McDonough and Deneris, 1997; Francis and Deneris, 2002; Xu et al., 2006) y con capacidad de formar canales funcionales entre ellos (Ramirez-Latorre et al., 1996). Estas subunidades se encuentran co-expresadas en muchas regiones cerebrales, con un patrón de expresión similar aunque no idéntico (Boulter et al., 1990). Las tres subunidades se caracterizan por estar implicadas en la conducta y la expresión fisiológica de la ansiedad en ratones (Salas et al., 2003a), y por participar en el efecto convulsionante de la nicotina así como en la actividad locomotora, de manera que la falta de estas subunidades produce una disminución de la sensibilidad a los efectos convulsionantes de la nicotina, e hipolocomoción (Salas et al., 2003b; Salas et al., 2003a; Salas et al., 2004b; Salas et al., 2004a). Además las subunidades  $\beta 4$  y  $\alpha 3$  también se han relacionado con memorias asociadas al miedo (Zhu et al., 2005). Sin embargo, de entre las tres subunidades, es la  $\beta 4$  la que se ha relacionado con los signos de la abstinencia a la nicotina en ratones (Salas et al., 2004a), aunque en humanos ésta se presente de forma emocional (anhedonia y disfunciones afectivas) en vez de presentarse a través de una respuesta somática (Shiffman et al., 2006). Todo ello, hace de este

cluster genómico un buen candidato para explicar la comorbilidad entre los trastornos de ansiedad y los adictivos, así como también la epilepsia, y más concretamente la ADNFL (Bonati et al., 2000).

## 1. HIPÓTESIS

La comorbilidad entre trastornos de ansiedad y de abuso de sustancias es un hecho bien establecido y que tiene importantes implicaciones clínicas, terapéuticas y pronósticas. Si bien los mecanismos patogénéticos de cada uno de estos trastornos por separado se conocen relativamente bien, el mecanismo que subyace a la comorbilidad no está bien delimitado. Se ha propuesto la existencia de factores genéticos, neurobiológicos y/o ambientales comunes a ambos trastornos, pero todavía no está claro qué genes podrían estar implicados o ser predisponentes a esta comorbilidad. Nosotros proponemos que los factores genéticos de susceptibilidad para la patología dual deberían modular componentes de desarrollo, y componentes funcionales, que están implicados en la coexistencia entre ambos trastornos. Por esta razón el trabajo, se centra en genes de dos familias: el receptor de la neurotrofina-3 (*NTRK3*) y un cluster que contiene los genes de las subunidades,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$  de receptores nicotínicos (*CHRNA3/A5/B4*). Así, *NTRK3* podría participar en el desarrollo y los mecanismos adaptativos a través de su implicación en proliferación, diferenciación y plasticidad neuronal, mientras que el cluster *CHRNA3/A5/B4* podría estar implicado en la activación de circuitos neuronales específicos que podrían ser comunes a ambos trastornos.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis, ha consistido en el estudio de la posible implicación funcional de los genes objeto de estudio en elementos de la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y abuso de sustancias mediante el uso de ratones transgénicos como modelo de aproximación experimental. Para ello hemos caracterizado el impacto de la sobreexpresión *in vivo* de los genes *NTRK3* y *CHRNA3/A5/B4* sobre el fenotipo conductual, neuromorfológico y neurofisiológico. Dado que intentamos comprender los mecanismos implicados en la comorbilidad entre el abuso de drogas y los trastornos de ansiedad, pero también delimitar las regiones cerebrales responsables de la co-ocurrencia de estos dos trastornos se han realizado estudios conductuales, farmacológicos con drogas de abuso como morfina o nicotina, y experimentos de caracterización histológica y molecular.

Los objetivos concretos han sido:

1. Validar el TgCHRNA3/A5/B4 como modelo de trastorno de ansiedad, para lo cual caracterizamos el fenotipo conductual de ratones con sobreexpresión del cluster CHRNA3/A5/B4 mediante pruebas neurológicas y conductuales generales, y su respuesta en pruebas específicas de ansiedad.
2. Estudiar los genes *NTRK3* y el cluster *CHRNA3/A5/B4* sobre la conducta asociada al consumo de sustancias de abuso, y caracterizar el perfil de abuso de sustancias en los ratones TgNTRK3 y TgCHRNA3/A5/B4.
3. Estudiar los mecanismos patogénéticos de la patología dual, y la morfología y/o función de regiones cerebrales comunes implicadas en trastornos de ansiedad y abuso de sustancias en el TgNTRK3.
4. Estudiar la modulación de los procesos de neuroplasticidad asociados a la dependencia y a la sobreexpresión de *NTRK3*, a través del análisis de los cambios de expresión de genes implicados en el desarrollo de la dependencia a opiáceos en el TgNTRK3

## 1. ANIMALES

Para la realización de los experimentos de esta tesis se utilizaron dos modelos murinos modificados genéticamente generados previamente en la Unidad de Transgénesis del “Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica (CGMM-IRO)”: **a/** Un modelo de sobreexpresión del receptor de NT-3 humano (*NTRK3*) bajo el promotor *PDGFβ* y **b/** un modelo de sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  de nAChRs humanos. Mientras que para la generación del TgNTRK3 se utilizaron técnicas de transgénesis convencionales, en el caso del cluster de subunidades de nAChRs, y dado que se trataba de sobreexpresar una estructura genómica compleja que agrupa tres genes funcionando coordinadamente, era necesario utilizar mayores longitudes de DNA en las construcciones transgénicas, para poder garantizar la introducción conjunta de todas las secuencias genéticas codificantes y potencialmente reguladoras, y de esta forma, asegurar una correcta expresión del gen, en tiempo, lugar y nivel. Por tanto la estrategia utilizada fue la introducción del DNA exógeno en un BAC (cromosoma artificial de bacteria) donde el transgén se introdujo de forma estable y sin sufrir roturas en el genoma de células somáticas o germinales de los ratones, y permitió integrar la secuencia genómica completa del cluster donde se localizan las tres subunidades. En ambos modelos se utilizaron dos líneas de ratones transgénicos, con sitios de integración del transgén diferentes, con la finalidad de descartar un posible efecto posicional del transgén (mutación insercional).

La cría y el mantenimiento de los ratones utilizados en la presente Tesis se realizó en el estabulario del “Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona” (PRBB). Los animales se estabularon en condiciones ambientales constantes: temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad (50-70%), en grupos de 3-5 ratones por cubeta ( $460 \text{ cm}^2$ ) con biberones, rejilla para pienso en acero inoxidable y cubierta filtrante hecha de material plástico de polisulfono. Las cubetas se ventilaban individualmente, con presión positiva y filtro HEPA, situadas en un rack o estantería con motores de impulsión y extracción, también con filtros HEPA. El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 12 h y los animales tenían libre acceso al agua y la comida. Con el fin de garantizar las condiciones sanitarias, el estabulario del PRBB dispone de un programa de centinelaje y control medio-ambiental. Todos los experimentos se

realizaron siguiendo procedimientos aprobados por el comité de ética del “Institut Municipal d’ Investigació Mèdica (IMIM)” y del PRBB, y cumpliendo la normativa establecida por las directrices de la Comunidad Europea (EU directrices nº 86/609, EU decreto 2001-486), así como la normativa internacional del uso de animales de laboratorio (nº A5388-01 (NIH)) para el apropiado cuidado y uso de animales con fines de investigación.

## 2. CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACIÓN

En todos los experimentos se utilizó un protocolo estándar de habituación (manipulación diaria, estabulación en el área de experimentación, habituación al aparato) con el fin de reducir el estrés, que podría afectar a la realización de las pruebas (Ader, 1970; Parfitt et al., 2004). Para ello, durante tres a cinco días consecutivos antes de las pruebas se realizaron sesiones de manipulación de 5 min de duración diarias en cada animal. Las pruebas se realizaron en la Unidad de Fenotipación Murina del Centro de Regulación Genómica, en una sala específicamente habilitada para realizar los experimentos conductuales, alejada de la zona de estabulación y dotada de un sistema de videoanálisis para permitir la recogida y posterior análisis de las variables experimentales. El experimentador siempre fue el mismo (X. Gallego; acreditado como *Experimentador*, por la Universidad Autónoma de Barcelona. Decreto 214/97 y ley 32/2007), y se mantuvo fuera del campo visual de los ratones durante la realización de las diferentes pruebas, desconociendo el genotipo de los animales. Tras la exposición de cada animal a los aparatos, éstos fueron lavados en profundidad con agua.

Por otro lado, utilizamos un número de animales elevado para todas las pruebas como requisito indispensable para reducir la demostrada variabilidad individual que suelen presentar los estudios de comportamiento. Ello es necesario incluso en cepas endogámicas, y en nuestro caso se hacía imprescindible ya que utilizamos una cepa híbrida B6/SJL, si bien con más de 20 retrocruzamientos sobre el fondo C57/BL6C, por lo que podemos considerar que trabajamos sobre un ratón congénico, y por lo tanto, con un fondo genético homogéneo en más de un 98%.

### 3. ANIMALES CON SOBREEXPRESIÓN DEL GEN NTRK3

El modelo de sobreexpresión del receptor de la NT-3, TgNTRK3, había sido validado anteriormente como modelo de trastorno de ansiedad (Dierssen et al., 2006) por tanto no ha sido necesario realizar la validación conductual (isomorfismo), sino que hemos podido iniciar directamente los experimentos de caracterización del perfil adictivo. Estos experimentos se dirigieron a evaluar la posible repercusión de la sobreexpresión de NTRK3 en los diferentes aspectos de la dependencia, como reflejo de la neuroplasticidad que podía ser modulada por TrkC, como había sido sugerido previamente (Akbarian et al., 2001). Para ello centramos nuestro estudio en la acción de la morfina, el desarrollo de tolerancia a los efectos centrales de este opiáceo, y el síndrome de abstinencia. Ello es debido a que en experimentos iniciales observamos cambios estructurales en el LC, que podrían modular estos procesos. Estos cambios fueron caracterizados en profundidad en el contexto de la Tesis y por otra parte analizamos las consecuencias moleculares en términos de la regulación de los sistemas NT-3/TrkC y BDNF/TrkB a nivel local en esta estructura.

#### 3.1. Colocalización de neuronas TH/TrkC positivas en el LC

##### 3.1.1. Inmunofluorescencia doble

Para este estudio se utilizó la técnica de inmunofluorescencia. Esta técnica es muy útil en el estudio de la colocalización de proteínas, ya que permite visualizar a la vez dos anticuerpos primarios mediante el uso de dos anticuerpos secundarios que emiten fluorescencia a longitudes de onda diferente. Para este experimento fue necesaria la fijación del tejido, por lo que los animales controles (n = 3) y TgNTRK3 (n = 3) fueron anestesiados con isoflurano y posteriormente perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 50 ml de PBS 0.1 M, pH 7.4 (Sambrook et al., 1989) seguido de 100 ml de PFA al 4% en PBS 0.1 M, mediante una bomba peristáltica (30 ml/min). Una vez perfundido, se extrajo el cerebro con cuidado y se postfijó a 4°C con el mismo fijador. A las 24 h el cerebro se sumergió en una solución de sacarosa al 30% y se congeló a -80°C. Mediante criostato se obtuvieron cortes coronales de 14 µm que contenían todo el LC [Bregma -5.34 a -5.80, (Franklin K, 1997)]. Éstos se colocaron en portaobjetos tratados previamente con poli-lisina al 10% para evitar así su desprendimiento. Los cortes fueron incubados durante 10



min en citrato sódico 10 mM, pH 6 con el fin de desenmascarar los antígenos. Después de dos lavados con PBS 0.1 M de 5 min, los cortes fueron bloqueados con suero fetal bovino (FBS) al 10% durante una hora y a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Posteriormente el tejido fue incubado durante 24 h con el anticuerpo primario, a la dilución correspondiente (ver tabla). Después, los cortes se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios fluorescentes y finalmente se lavaron con PBS 0.1 M y se montaron con cubreobjetos utilizando una solución acuosa (mowiol). Las imágenes se obtuvieron mediante la utilización de un microscopio confocal espectral (Leica TCS SP2).

ANTICUERPOS	CASA COMERCIAL	DILUCIONES
Anti-TrkC	Santa Cruz	1:100
Anti-TH	Sigma	1:4000
Alexa Fluor 546 Anti-Rabbit	Molecular Probe	1:400
Alexa Fluor 488 Anti-mouse	Molecular Probe	1:400

### 3.2. Estudio farmacológico

El estudio farmacológico del TgNTRK3 mediante el uso de opiáceos y agonistas adrenérgicos (clonidina) permitió dilucidar las alteraciones producidas en el LC producida por la sobreexpresión de TrkC. Dado el papel fundamental que esta estructura juega a su vez en la dependencia opiácea y en trastronos de pánico, era necesario profundizar en la caracterización de este fenotipo. Para este estudio se utilizó una n = 15-20 ratones macho para cada genotipo y grupo de tratamiento, con edades comprendidas entre 2 y 4 meses.

#### 3.2.1. Fármacos

La morfina fue suministrada por el Ministerio de Sanidad y Consumo (España). La naloxona y la clonidina se adquirieron en Sigma Chemical Co. (Madrid, España). Ambos fármacos se disolvieron en suero salino fisiológico (0.9% NaCl) para su posterior administración.

### 3.2.2. Efectos agudos de la morfina en el TgNTRK3

El efecto analgésico agudo inducido por la administración de morfina (10 mg/kg, subcutáneo (s.c.)) fue evaluado mediante la utilización de dos tests de nocicepción: el test de inmersión de cola y el test de la placa caliente. Con la finalidad de habituar los animales a los aparatos, éstos fueron sometidos al test de inmersión de cola y a las cajas de actividad durante dos días, antes del inicio del experimento. El día del experimento, la actividad locomotora fue evaluada tras la administración de morfina (10 mg/kg, s.c.), durante 30 min. Inmediatamente después del registro de la actividad locomotora, los animales se sometieron al test de inmersión de cola e inmediatamente después, al de la placa caliente.

#### 3.2.2.1. Test de inmersión de cola:



La prueba consiste en sumergir la cola de los ratones en un baño termostático con agua caliente ( $50 \pm 0.1$  °C) (Clifton, instrumentos científicos, Inglaterra) hasta un tiempo máximo (*Cut off*) de 15 s para evitar dañar el tejido.

Para ello, los animales fueron inmovilizados mediante una malla de la cual, únicamente sobresalía la cola. El umbral nociceptivo y el efecto analgésico fueron evaluados midiendo la latencia de retirada de la cola.

#### 3.2.2.2. Test de la placa caliente:



Los animales se colocaron encima de una placa caliente a una temperatura constante de  $52 \pm 0.1$  °C, rodeado por un cilindro de metacrilato de 19 cm de diámetro y 19 cm de alto. En este test se registraron dos respuestas representativas del umbral nociceptivo, el lameteo de las patas y la respuesta de salto.

La latencia de cada uno de los dos umbrales se contabilizó hasta un máximo de 30 s para la respuesta de lameteo de las patas, y de 240 s para la de salto.

#### 3.2.2.3. Actividad locomotora:



La actividad locomotora fue evaluada mediante la utilización de cajas de actividad (9 x 20 x 11 cm; Imetronic, Lyon, France). Las cajas estaban dotadas de una hilera de células fotoeléctricas en sus paredes situadas a 2 cm del suelo que permitían el registro de la actividad horizontal, y otra hilera situada 6 cm por encima del suelo que permitía el registro de la actividad vertical. El día del

test, los animales fueron estabulados individualmente en las cajas, y la actividad locomotora total (deambulaciones más movimientos horizontales) fue registrada durante 30 min en condiciones de iluminación no aversivas (5-15 lux).

### ***3.2.3. Desarrollo de la tolerancia y sensibilización a los efectos de la morfina en el TgNTRK3***

La tolerancia se define como la pérdida de potencia de una droga o de un fármaco después de una administración repetida, o cuando la dosis necesaria para producir el mismo efecto es cada vez más alta. La sensibilización, contrariamente a la tolerancia, se define como el aumento de alguno de los efectos producidos por la droga o el fármaco después de su administración crónica. La morfina provoca ambos fenómenos, observándose una disminución de sus efectos antinociceptivos y un incremento en la actividad locomotora. Dos días antes de evaluar los efectos de la administración crónica de la morfina, se registró la respuesta nociceptiva basal mediante el test de inmersión de la cola y la actividad locomotora basal mediante las cajas de actividad. Para el estudio del desarrollo de tolerancia y sensibilización se administró morfina (10 mg/kg, s.c.) crónicamente dos veces al día con un intervalo de 12 h durante 7 días. La actividad locomotora fue medida inmediatamente después de la inyección de morfina de la mañana. Los cambios producidos en el umbral nociceptivo fueron evaluados mediante el test de inmersión de cola (días 1-7) justo después de los 30 min en las cajas de actividad.

### ***3.2.4. Estudio del síndrome de abstinencia a la morfina en el TgNTRK3***

El síndrome de abstinencia es el conjunto de manifestaciones somáticas que aparecen al retirar el consumo de una determinada droga para la que se ha generado dependencia. En nuestros experimentos, el síndrome de abstinencia a la morfina fue inducido mediante la administración de naloxona (1 mg/kg, s.c.). La precipitación del síndrome de abstinencia con un antagonista específico nos permite evaluar los signos somáticos característicos de la abstinencia al mismo tiempo en todos los animales, mediante escalas de puntuación para la cuantificación de estos signos (Gellert and Holtzman, 1978). Para ello, los animales se colocaron individualmente en el interior de un cilindro de plástico transparente (30 cm de diámetro, 50 cm de alto) que permitía su observación. El comportamiento de los animales fue observado en dos sesiones: una primera sesión de 15 min antes de la

inyección de naloxona, descartando así diferencias a nivel basal, y una segunda sesión de 30 min después de la inyección de naloxona. Durante los 45 min se contabilizaron las sacudidas, los saltos, el temblor de las patas, y los “sniffings”. La ptosis, la diarrea, la masticación, el temblor del cuerpo y la piloerección se evaluaron en periodos de 5 min y se contabilizaron como presencia o ausencia de cada signo. Con el fin de sumar los resultados obtenidos de las diferentes observaciones, se realizó un cálculo de la puntuación global obtenida de cada animal. Para la obtención de esta puntuación global y para asignar a cada uno de los signos un valor proporcional, la puntuación obtenida en cada signo fue multiplicada por una constante, previamente definida (Maldonado et al., 1989).

#### ***3.2.4.1. Provocación del síndrome de abstinencia en el TgNTRK3 tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de morfina***

En nuestros experimentos, se había provocado dependencia mediante dos protocolos de administración. En el primero, para inducir la dependencia los animales fueron inyectados mediante dosis crecientes de morfina intraperitoneal (i.p.) dos veces al día con un intervalo de 12 horas: 1<sup>er</sup> día, 20 mg/kg; 2<sup>o</sup> día, 40 mg/kg; 3<sup>er</sup> día, 60 mg/kg; 4<sup>o</sup> día, 80 mg/kg; 5<sup>o</sup> día, 100 mg/kg; 6<sup>o</sup> día (solo por la mañana), 100 mg/kg. Los animales controles de ambos genotipos se trataron con salino (0.9% NaCl) siguiendo el mismo protocolo de inyección. El síndrome de abstinencia se provocó inyectando naloxona (1 mg/kg, s.c.), dos horas después de la última administración de morfina.

#### ***3.2.4.2 . Efecto de la clonidina sobre el síndrome de abstinencia en el TgNTRK3 tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de morfina***

Para estudiar los efectos de la clonidina sobre el síndrome de abstinencia en el TgNTRK3, ésta se inyectó (0.1 mg/kg, i.p.) 30 min antes de la inyección de naloxona. Para inducir la dependencia los animales fueron inyectados mediante dosis crecientes de morfina siguiendo el protocolo anterior. El síndrome de abstinencia se provocó inyectando naloxona (1 mg/kg, s.c.) 2 h después de la última administración de morfina.

**3.2.4.3. Electrofisiología: Estudio de la funcionalidad de los receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos del LC durante la dependencia a morfina en el TgNTRK3**

La actividad neuronal del LC se estudió mediante registros extracelulares de célula única. Para este estudio se utilizó el mismo protocolo de administración que el utilizado para la inducción de abstinencia a la morfina. Para la realización del experimento se utilizó un grupo de ratones machos tratados con salino (0.9% NaCl) (controles, n = 6; TgNTRK3, n = 8) y otro grupo de ratones machos tratados con morfina (controles, n = 9; TgNTRK3, n = 8). Los animales fueron anestesiados con Hidrato de Cloral (400 mg/kg, i.p.) tras 1-4 h después de la última inyección de morfina, y posteriormente decapitados. El cerebro fue extraído y cortado en el vibrátomo en cortes coronales de 400  $\mu$ m de una sección del tronco del encéfalo que incluía el LC. Los cortes fueron después incubados con carbógeno y mantenidos en una cámara a 33°C con recirculación de líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) a una velocidad de 1-1.5 ml/min. La señal extracelular fue registrada a través de micropipetas de cristal rellenas de una solución de NaCl 50 mM, y después fue monitorizada mediante un amplificador, un osciloscopio y una unidad de audio. La actividad neuronal fue registrada en un ordenador con un programa que generaba histogramas (HFPCP®, Cibertec SA, Madrid, España) a intervalos de 10 s. La abstinencia a la morfina se producía espontáneamente ya que la morfina que quedaba en el corte desaparecía después de los lavados que se realizaron durante 90 min antes del registro. El lavado total de morfina se confirmaba al final de cada experimento mediante la aplicación de naloxona (1  $\mu$ M). Se considera confirmado cuando la naloxona no provocaba efecto alguno. Para evaluar la funcionalidad de los receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos en el LC, se construyeron curvas dosis-respuesta frente a clonidina en animales tratados con salino y animales tratados con morfina de ambos genotipos. Para ello se administraron dosis crecientes de clonidina ( $10^{-8}$  M -  $10^{-3}$  M) en intervalos de 10 min hasta observar una total inhibición de la actividad neuronal.

**3.2.4.4. Provocación del síndrome de abstinencia en el TgNTRK3 tras desarrollar dependencia mediante dosis constantes de morfina**

En el segundo protocolo, la dependencia se provocó mediante la administración de dosis constantes de morfina (20 mg/kg, i.p.) dos veces al día con un intervalo de 12 h, durante 6 días. Los controles farmacológicos de ambos genotipos se trataron con

salino (0.9% NaCl) siguiendo el mismo protocolo de inyección. El síndrome de abstinencia se provocó inyectando naloxona (1 mg/kg, s.c.) 2 h después de la última administración de morfina.

#### **3.2.4.5. Laberinto circular elevado (O-Maze): Estudio de la respuesta ansiosa en ratones TgNTRK3 durante la abstinencia a morfina**



Hay que destacar que el síndrome de abstinencia de todas las drogas de abuso se encuentra acompañado por un componente emocional negativo. Para estudiar este componente en nuestro modelo, se utilizaron los ratones abstinentes tratados con dosis constantes de morfina (20 mg/kg, i.p.). Los ratones fueron sometidos al laberinto circular elevado (O-Maze) 30 min después de la inyección de naloxona. El laberinto circular consiste en un aparato circular de 40 cm de diámetro, construido en material polivinílico de color negro y dividido en 4 zonas. Dos de las zonas, situadas en lados opuestos se caracterizan por estar protegidas mediante paredes opacas de 15 cm, mientras que las otras dos están desprotegidas. El aparato se encuentra elevado a 40 cm del suelo, y sobre él se sitúa una cámara de vídeo conectada a un ordenador con la que se registran todos los movimientos del ratón. Este sistema está conectado a un ordenador que analiza la información a través de un programa informático específico (SMART, System Motor Activity Record and Tracking, PANLAB, SL, España). Este programa permite analizar la actividad horizontal a través de parámetros como la distancia recorrida y la velocidad media, así como evaluar el nivel de actividad realizada en diferentes zonas. El test consiste en colocar al ratón en una de las zonas protegidas, y observarlo durante 5 min midiendo el tiempo de permanencia en cada zona, el número de entradas en las zonas, la actividad vertical, los acicalamientos y las defecaciones.

#### **3.2.5. Hibridación *in situ*: Estudio de la expresión de TrkC, TrkB y sus ligandos NT-3 y BDNF en el LC**

Para este estudio se utilizó la técnica de hibridación *in situ* que permite la detección del mRNA mediante una ribosonda específica marcada radiactivamente. Para ello se utilizaron ratones machos TgNTRK3 (n = 3) y controles (n = 3) para cada una de las condiciones (sin tratamiento, salino crónico, salino+naloxona, morfina crónica y morfina+naloxona). Los animales se sacrificaron 4 h después de la última inyección

de morfina para el estudio del tratamiento crónico y 2 h después de la naloxona para el estudio de la dependencia. El mismo protocolo se utilizó para el grupo de animales tratados con salino. Después, se extrajeron los cerebros, se congelaron en hielo seco, y se cortaron en un criostato en secciones coronales (14  $\mu\text{m}$ ) que después se procesaron con ribosondas de TrkB, TrkC, NT-3, y BDNF. Las sondas de TrkB y TrkC que se utilizaron no distinguían entre las formas de humano y ratón, y reconocían tanto la forma completa como las truncadas. Después de lavar en PBS, el tejido fue desproteinizado con 0.2 M HCl durante 10 min, acetilado con 0.25% de anhídrido acético en 0.1 M de etanolamina durante 10 min, post-fijado en 4% de PFA, y deshidratado con dosis crecientes de etanol. Los cortes se incubaron durante 16 h en una cámara húmeda a 53°C con 3 X 10<sup>5</sup> c.p.m. de sonda antisentido en 150  $\mu\text{l}$  de un cóctel de hibridación (50% formamida, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.3 M NaCl, 0.1 M ditioneitol, 0.5 mg/ml yeast tRNA, 0.1 mg/ml poly(A+) RNA, 1X solución de Denhard, y 10% de sulfato de dextrano). Las sondas antisentido de cRNA para la detección de los transcritos se prepararon in vitro con una T7 RNA polimerasa (Promega, WI, USA) y [<sup>35</sup>S] UTP (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Como control del experimento se obtuvo in vitro, una sonda sentido cRNA utilizando T3 RNA polimerasa (Promega, WI, USA). Después de la hibridación, los cortes fueron lavados a temperatura ambiente en 1 X SSC, seguido de dos lavados en 1 X SSC a 37°C durante 15 min cada uno. Los RNA de cadena única se digirieron mediante tratamiento con RNase (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 30 min a 37°C en 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, y 2 mM EDTA. El tejido se lavó dos veces en 1X SSC en 65°C durante 10 min, y fue deshidratado en etanol, y secado a temperatura ambiente. Los cortes se expusieron a un film  $\beta$ -max x-ray (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) durante 20 días y se sumergieron en una fotoemulsión LM-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), expuesta a 4°C durante 2 meses. Después, se revelaron en D19 (Eastman Kodak), y fueron fijados y contrateñidos con violeta de cresilo.

### **3.2.6. Western Blot: Cuantificación de los niveles de TH durante la dependencia a morfina en el TgNTRK3**

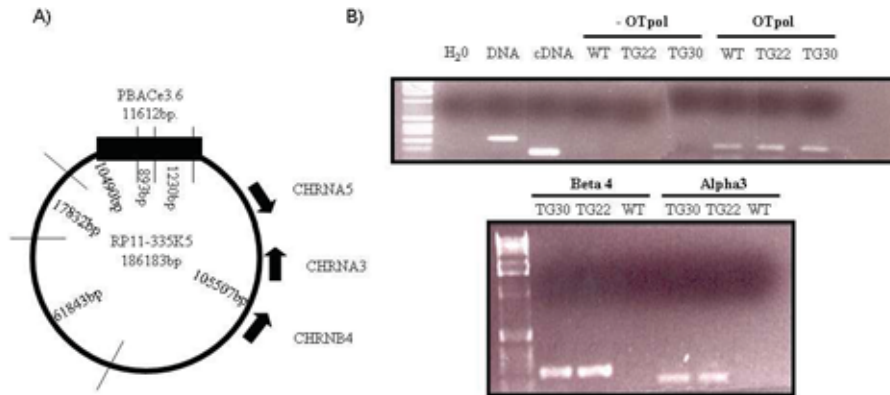
Para la cuantificación de los niveles de TH se utilizó la técnica de western blot. Para ello se usaron ratones machos TgNTRK3 (n = 6) y controles (n = 6) para cada uno de los tratamientos (salino crónico, salino+naloxona, morfina crónica y

morfina+naloxona) excepto en el grupo de animales no tratados, en que se utilizaron ratones machos TgNTRK3 (n = 12) y controles (n = 12). Al igual que para la cuantificación de neurotrofinas, los animales se sacrificaron 4 h después de la última inyección de morfina para el estudio del tratamiento crónico y 2 h después de la naloxona para el estudio de la dependencia. En el grupo de animales tratados con salino se utilizó el mismo protocolo. Los cerebros fueron rápidamente extraídos y diseccionados en hielo. Las muestras fueron homogenizadas en un tampón de lisis (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, PBS 0.1 M con 0.2% Tritón e inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). Los lisados fueron centrifugados (14000 X g durante 20 min a 4°C), y las proteínas se cuantificaron usando el protocolo BCA (Pierce, Rockford, USA). En un gel de poliacrilamida al 10% se sometieron a electroforesis 20 µg de proteína para cada muestra que posteriormente se transfirieron a una membrana Hybond-P (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany). Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-tirosina hidroxilasa como primario (1:15000; Sigma, MO, USA) y un secundario peroxidasa-conjugado contra ratón (1:2000; DAKO, Ely, UK). La detección de la proteína se realizó usando el protocolo ECL (Pierce, Rockord, USA). Mediante análisis densitométrico se cuantificaron las bandas obtenidas (Quantity One Image software). Como control interno se usó β-actina (1:2000; Sigma, MO, USA), y se cuantificaron los niveles relativos de proteína.



#### 4. TRANSGÉNICOS DE SOBREENPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 3$ , $\alpha 5$ y $\beta 4$ DE nAChRS

Las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  de nAChRs se agrupan en un cluster genómico en el cromosoma 15, con secuencias reguladoras comunes localizadas en diferentes niveles. Para estudiar estas grandes regiones o estructuras genómicas complejas que agrupan diversos genes funcionando coordinadamente, es necesario utilizar mayores longitudes de ADN en las construcciones transgénicas, para poder garantizar la introducción conjunta de todas las secuencias genéticas codificantes y potencialmente reguladoras, y de esta forma, asegurar una correcta expresión del gen, en tiempo, lugar y nivel. Para la integración completa, estable, y transmisible de estos fragmentos de ADN de grandes dimensiones, es necesaria la producción de construcciones de ADN utilizando como vectores para el transgén o secuencia de ADN exógeno de interés, preferentemente secuencias de gran tamaño presentes en bacteriófagos, cósmidos, o, como en este caso, un BAC. Para la obtención de los animales con sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  de nAChRs, fue necesaria la digestión del BAC RP11-335K5 (AC067863) mediante el enzima de digestión Agel, con el que se obtuvo un fragmento de 105507bp correspondiente a las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  de nAChRs humanos (Figura 1A). Posteriormente, el transgén se insertó, mediante microinyección, en oocitos fertilizados de ratones B6/SJL y se obtuvieron dos líneas (22 y 30), cuya expresión fue confirmada mediante RT-PCR (Figura1B). El genotipado de los animales se realizó mediante PCR utilizando dos pares de cebadores con el fin de confirmar los resultados. (F: 5'-gagccaagatcccaccactc-3' R: 5'-ccaggcatccggattgtat-3') para el CHRNA4 y (F: 5'-gaaagacttgagtgggcagc-3' y R: 5'-caaccctgtctgtctctagc-3') para el CHRNA5.



**Figura 1. A)** Representación esquemática del BAC RP11-335K5. **B)** Expresión del transgén  $\alpha 3/\alpha 5/\beta 4$  mediante RT-PCR

#### 4.1 Western Blot

Los niveles de expresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  de receptores nicotínicos así como de las subunidades NR1, NR2A y NR2B de receptores de NMDA se determinaron mediante la técnica de western blot. Los niveles de expresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  endógenas se realizaron mediante la técnica de PCR cuantitativa (A. Amador). Para la técnica de western blot se sacrificaron ratones machos TgCHRNA3/A5/B4 ( $n = 3$ ) y controles ( $n = 3$ ). Los cerebros fueron rápidamente extraídos y diseccionados en hielo, obteniendo corteza e hipocampo. Las muestras fueron homogenizadas en un tampón RIPA de lisis (1% Nonidet P-40, deoxicolato sódico 0.5% y 0.1% SDS en PBS 0.1 M, pH 7.4) junto con inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). Los lisados fueron centrifugados (14,000 X g durante 20 min a 4°C), y las proteínas se cuantificaron usando el protocolo BCA (Pierce, Rockford, USA). En un gel de poliácridamida al 10% se sometieron a electroforesis 40  $\mu$ g de proteína para cada muestra que posteriormente se transfirieron a una membrana Hybond-P (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany). La detección de la proteína se realizó usando el protocolo ECL (Pierce, Rockord, USA). Mediante análisis densitométrico se cuantificaron las bandas obtenidas (Quantity One Image software). Como control interno se usó  $\beta$ -actina (1:2000; Sigma, MO, USA) o  $\alpha$ -Tubulina (1:15000; Sigma, MO, USA), y se cuantificaron los niveles relativos de proteína.

<b>ANTICUERPOS</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>DILUCIONES</b>
Anti-AchR $\alpha$ 3	Santa Cruz	1:200
Anti-AchR $\alpha$ 5	Santa Cruz	1:200
Anti-AchR $\beta$ 4	Abcam	1:200
Anti-NR1	Sigma-Aldrich	1:400
Anti-NR2A	Sigma-Aldrich	1:200
Anti-NR2B	Sigma-Aldrich	1:200

## **4.2. Caracterización conductual**

Para el estudio conductual de este modelo se utilizaron entre 15 y 20 ratones machos para cada genotipo, de edades comprendidas entre 2 y 4 meses. Además de las baterías generales somatosensoriales y neurológicas, se han empleado pruebas neuropsiquiátricas específicas.

### **4.2.1. Pruebas neurosensoriales (Protocolo SHIRPA)**

El protocolo SHIRPA (Rogers et al., 1997) ha sido utilizado con el fin de evaluar, de forma rápida y cualitativa, alguna alteración fenotípica neurológica o neurosensorial. Este test, muy utilizado en animales modificados genéticamente, podría compararse a un examen general, neurológico y psiquiátrico realizado en humanos. Consiste en una batería de tests conductuales que se realizan colocando al ratón en un cilindro de Perpex transparente (11 cm de diámetro, 15 cm de alto) y observando durante 5 min su comportamiento, registrando actividad, estereotipias, aspecto general y erizamiento del pelo.

Posteriormente se pesa al animal y se coloca en una caja de metacrilato transparente (56 cm largo x 34 cm ancho x 19 cm alto) en la que se realizan las pruebas que se recogen en la tabla siguiente.

PRUEBA	DESCRIPCIÓN	VALORACIÓN	SISTEMA NEUROSENSORIAL
Respuesta de alcance	Cogiendo al animal por la cola se acerca a una superficie plana	0 = no extiende las patas 1 = extiende tras el contacto con la superficie 2 = extiende tras el contacto de bigotes 3 = antes de contactar con los bigotes 4 = extiende las patas al iniciar el acercamiento	Visión/ Vestibular
Capacidad visual	Sujetando al animal en suspensión por la cola se le acerca un lápiz	0 = no extiende las patas 1 = extiende tras el contacto con el lápiz 2 = extiende antes de contactar con los bigotes	Visión
Respuesta de sobresalto	Se produce un sonido de 50 db mecánico	0 = sin reacción 1 = mueve pabellón auricular 2 = salta 1 cm. 3 = salta más de 1 cm.	Audición
Enroscamiento	Se coge al animal por la cola	0 = sin enroscamiento 1 = enroscamiento	Sistema vestibular
Reflejo enderezamiento	Se lanza al animal produciendo un giro	0 = cae sobre las patas 1 = cae de lado y se incorpora 2 = cae de espaldas y se incorpora 3 = cae de espaldas y no puede girarse	Sistema vestibular
Geotaxia negativa	Se coloca al animal mirando hacia abajo en una gradilla metálica	0 = gira y asciende por la gradilla 1 = gira y se queda parado 2 = se mueve pero sin girar 3 = no se mueve en 30 segundos 4 = se cae	Sistema vestibular Fuerza muscular
Reflejo corneal	Se acerca una torunda al ojo del animal	0 = sin reacción 1 = un parpadeo 2 = múltiples parpadeos	Reflejo corneal
Reflejo de retirada de pabellón auricular	Se toca el extremo del pabellón auditivo con una torunda	0 = sin reacción 1 = retrae un poco el pabellón auricular 2 = retrae muchas veces el pabellón auricular	Tacto
Respuesta de escape	Se toca la espalda del animal con el dedo	0 = sin reacción 1 = escapa tras tocarlo con firmeza 2 = escapa rápidamente tras un leve toque 3 = escapa sólo al aproximarse	Tacto/ Reflejo
Reflejo de retirada de la pata	Con unas pinzas se presiona la pata trasera del animal en la articulación	0 = sin reacción 1 = retracción de la pata suave 2 = retracción de la pata moderada 3 = retracción de la pata rápida 4 = retracción de la pata muy vigoroso y repetido	Nocicepción
Piloerección		0 = ausente 1 = presente	Ansiedad/excitación
Elevación de la cola	Se observa el grado de elevación de la cola	0 = flácida 1 = posición horizontal 2 = elevada (cola de Straub)	Ansiedad/excitación

#### 4.2.2. Pruebas sensoriomotoras

Como pruebas complementarias a la batería SHIRPA se ha realizado una batería de pruebas neuromotoras:

##### 4.2.2.1. Prueba de equilibrio:



Esta prueba permite evaluar el equilibrio del ratón y su correcta realización depende de la integridad del sistema vestibular. La prueba consiste en colocar al ratón en el centro de una barra de madera (50 cm largo x 12 mm ancho) elevada a una altura de 40 cm durante un periodo de 40 s. Se evalúa la ejecución de la prueba otorgando puntuaciones semicuantitativas en función de la actividad que el ratón desarrolla en la barra, de este modo si el ratón cae la puntuación será 0, si se mantiene en el centro de la barra será 1, si se mueve del centro 2, y 3 si se desplaza hasta el extremo de la barra. También se registra el tiempo que permanece en la barra mediante la latencia de caída.

##### 4.2.2.2. Prueba de la percha:



La prueba de la percha se utiliza para analizar el reflejo prensil, la capacidad de tracción y la coordinación motora. Consiste en una percha metálica elevada 40 cm sobre el suelo. El reflejo prensil se evalúa suspendiendo al ratón de la percha por las extremidades delanteras durante 5 s. Se puntúa: 0 si cae y 1 si se mantiene agarrado a la percha. La capacidad de tracción puede medirse en función del número de patas traseras que el animal consigue elevar a la percha, la puntuación será 0 si no consigue alzar las patas, 1 si eleva una pata y 2 si logra alzar las dos patas traseras. Se realizan tres ensayos consecutivos de esta prueba. Finalmente, se coloca de nuevo el animal en la percha y durante 60 s se registra la latencia de caída, la latencia de llegada al extremo de la percha y el número de desplazamientos realizados.

#### 4.2.3. Actividad locomotora



Para el estudio de la actividad locomotora de los animales, se utilizaron cajas de actividad LE 881 (PANLAB, SL, España). Estas cajas (45 cm largo x 45 cm ancho) consisten en una serie de sensores fotoeléctricos de movimiento que permiten tanto el estudio de la actividad horizontal como el de la vertical. La actividad basal de los

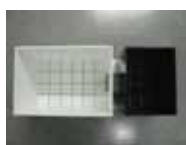
animales se estudió durante una hora bajo condiciones de iluminación no aversivas (20-25 lux) y los resultados se recogieron en intervalos de 15 min, en un ordenador contiguo, mediante la utilización de un software especializado (Actitrack, PANLAB, SL, España)

#### **4.2.4. Campo abierto**



Para poder medir la actividad locomotora en situaciones más aversivas y novedosas se utilizó el campo abierto. Este aparato consiste en un cubo de plexiglás (100 cm largo, 100 cm ancho, 50 cm alto) dividido en 25 cuadrados (10 cm largo x 10 cm ancho) delimitados con líneas negras sobre una superficie blanca. Los animales se colocaron en el centro del aparato, bajo condiciones aversivas de iluminación (200 lux) y durante 5 min se registró la trayectoria de los animales mediante un sistema de videograbación situado encima del aparato, y conectado a su vez a un ordenador que analizaba la información a través de un programa informático específico (SMART, PANLAB, SL, España). Este programa permitió analizar la actividad horizontal a través de parámetros como la distancia recorrida y la velocidad media, así como evaluar el nivel de ansiedad a través de la actividad realizada en una zona central, delimitada virtualmente (cuadrado central de 80 cm largo x 80 cm ancho) que se considera más ansiogénica.

#### **4.2.5. Paradigma luz-oscuridad**



La prueba de las transiciones luz-oscuridad se basa en la tendencia innata de los ratones a buscar refugio en una zona oscura y a evitar las zonas iluminadas. Esta prueba al igual que en el campo abierto se utiliza para evaluar los niveles de ansiedad de los animales, y también su grado de impulsividad. El aparato consiste en un caja (15 cm largo x 20 cm ancho x 25 cm alto) con paredes y suelo negros sometida a condiciones de iluminación suave (25 lux), conectada a través de un túnel de 4 cm (zona intermedia o de transición) hasta una caja de mayor tamaño (30 cm largo x 20 cm ancho x 25 cm alto) con paredes y suelo blancos sometida a una iluminación aversiva (200 lux). El estudio consistió en colocar a los animales en la zona oscura, de cara al túnel y contabilizar la actividad locomotora en cada compartimiento, así

como la latencia de entrada en el compartimiento iluminado, y el tiempo de permanencia en cada zona.

#### **4.2.6. Test de miedo condicionado**



El test de miedo condicionado permite el estudio de la memoria relacionada con el miedo, mediante el análisis de la conducta de congelamiento del ratón. El estímulo condicionado es un sonido de 1800 Hz. Aunque al principio este estímulo es neutral, cuando se asocia con una descarga eléctrica (0.4 mA) (estímulo incondicionado) se convierte en estímulo condicionado. El aparato (PANLAB, SL, España) consiste en un habitáculo (67 cm largo, 53 cm ancho, 55 cm alto) con sensores de movimiento, luz (40 W), altavoz, ventilador, y dispone de un control volumen del sonido y de un control de la intensidad de la descarga eléctrica. El experimento se realiza en dos días. El primer día se realiza la sesión de aprendizaje en que el ratón asocia el estímulo condicionado al incondicionado. Consiste en dejar al animal explorar libremente el compartimiento durante 120 s y 30 s después de la exposición al estímulo condicionado (1800 Hz) se administra una descarga eléctrica (0.4 mA) de 2 s. Finalmente se permiten 30 s más de libre exploración. El segundo día (Test), la sesión consiste en 2 min de libre exploración seguida de 3 min de exposición al estímulo condicionado. El tiempo que el animal permanece quieto (freezing o respuesta de congelamiento) se registra mediante un paquete informático específico PANLAB, SL, España) y se calcula el porcentaje de tiempo de freezing frente al total de tiempo de exposición al sonido.

#### **4.3. Estudio farmacológico**

El estudio farmacológico se centró en dos cuestiones fundamentales: la definición de la sensibilidad al efecto convulsionante de la nicotina y el posible efecto diferencial en sus propiedades reforzantes así como también en memoria y aprendizaje. La primera cuestión permitía dilucidar si el incremento en sitios de fijación para nicotina tenía una repercusión funcional y la segunda permitía establecer si el incremento de sensibilidad podía relacionarse con un incremento en el potencial adictivo de la nicotina en estos animales y por tanto determinar una mayor susceptibilidad al abuso de sustancias.

#### 4.3.1. Fármacos

El tartrato de nicotina se adquirió en Sigma Chemical Co. (Madrid, España) y se disolvió en suero fisiológico (0.9% NaCl) para su posterior administración.

#### 4.3.2. Estudio del efecto convulsivante de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4

Tres días antes del experimento los animales fueron manipulados y habituados al procedimiento de inyección en la misma sala de experimentación, evitando así posibles efectos de comportamiento no atribuibles a la nicotina. Previamente al experimento y con el fin de obtener la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) se utilizaron n = 3 ratones machos por genotipo a los que se administraron dosis crecientes de nicotina. Dado que la DL<sub>50</sub> (dosis a la que convulsionan o mueren el 50% de los animales) fue diferente en ambos genotipos, el día del experimento los animales controles (n = 6 por dosis) fueron inyectados con 4, 6, y 12 mg/kg de nicotina tartrato y los TgCHRNA3/A5/B4 (n = 6 por dosis) con 12, 25 y 50 mg/kg. La nicotina se administró s.c. en un volumen de 10 µl/g de peso del ratón. Inmediatamente después de la inyección los animales se dejaron en una caja de plexiglás y las respuestas comportamentales fueron observadas y registradas durante 5 min mediante una cámara de video. Los efectos de la nicotina se puntuaron de 0 a 7 de la siguiente manera: 0, sin efectos; 1, alteraciones en la actividad locomotora; 2, taquicnea y temblores; 3, arqueamiento; 4, convulsiones mioclónicas; 5, convulsiones clónicas; 6, convulsiones tónicas; 7, muerte.

#### 4.3.3. Estudio del efecto reforzador de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4



Para este estudio se utilizaron ratones machos TgCHRNA3/A5/B4 (n = 15) y controles (n = 15) entre 2 y 4 meses de edad. Los efectos reforzantes de la nicotina fueron evaluados mediante el test de preferencia de plaza. Este aparato consiste principalmente en dos compartimentos cuadrados con diferentes texturas y marcas visuales (puntos en las paredes y suelo rugoso, o rayas en las paredes y suelo liso), separados por una zona central triangular. La prueba consiste en: 1) una fase de pre-condicionamiento donde los animales se habitúan al aparato y se observa si hay preferencia por alguno de los compartimentos; 2) una fase de condicionamiento a la droga donde los animales asocian el compartimiento donde



se encuentran, con los efectos reforzantes de la droga; y 3) el día del test, en que se registra la preferencia por el compartimiento donde se ha inyectado la droga.

En la fase de pre-condicionamiento, cada ratón se colocó en la zona central, con acceso libre a ambos compartimentos, y durante 18 min se registró el tiempo de permanencia en cada zona. El tiempo de permanencia en la zona central se repartió equitativamente entre los valores obtenidos en cada compartimiento. Durante la fase de condicionamiento, los animales fueron tratados alternadamente, con nicotina (0.5 mg/kg) o salino (0.9% NaCl) durante 8 días. Inmediatamente después de cada inyección los animales se colocaron en el compartimiento correspondiente a “salino” o “nicotina” durante 20 min. La nicotina se administró los días impares (1, 3, 5, y 7) y el salino los días pares (2, 4, 6, y 8). Un grupo de animales recibieron salino todos los días, para controlar la posibilidad de que factores ajenos a la droga modularan la preferencia por uno u otros compartimentos. El día del test, cada ratón se colocó en el medio de la división central teniendo libre acceso a ambos compartimentos, y durante 18 min se registró el tiempo de permanencia en cada zona. El tiempo de permanencia en la zona central se repartió equitativamente entre los valores obtenidos en cada compartimiento.

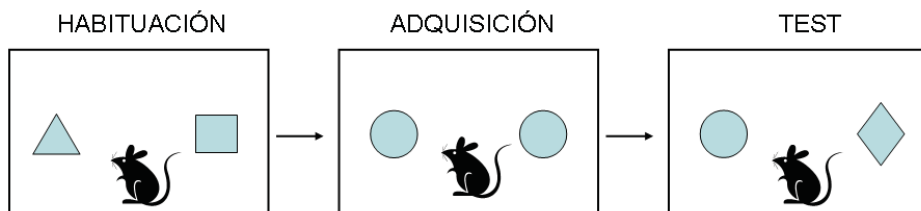
#### ***4.3.4. Reconocimiento de objetos en el campo abierto tras administración de nicotina***

Para este estudio se utilizaron ratones machos TgCHRNA3/A5/B4 (n = 6-7) y controles (n = 6-7) por grupo de tratamiento (salino o nicotina). La prueba del reconocimiento de objetos se realizó en el campo abierto, formado por un cubo de plexiglás (100 cm largo, 100 cm ancho, 50 cm alto) dividido en 25 cuadrados (10 cm largo x 10 cm ancho). El campo abierto se colocó en una habitación bajo condiciones no aversivas de iluminación (60 lux). Tanto el aparato como los objetos se limpiaron con agua al finalizar cada sesión, para evitar así un posible rastro olfativo en la siguiente sesión. Los objetos fueron de unos 15 cm de alto, diseñados mediante piezas de Lego y con un peso suficiente para evitar que los ratones pudieran desplazarlo. Todos los objetos fueron probados previamente para descartar que los ratones tuvieran preferencia espontánea por alguno de ellos. Los animales se dejaron 30 min en la sala de experimentación antes de empezar el experimento. El día antes del experimento, los animales fueron sometidos a una

sesión de habituación en el campo abierto, permitiéndoles explorar libremente el aparato, durante al menos 15 min., en presencia de dos objetos diferentes pero con la misma preferencia. Al día siguiente (el día del experimento) los animales fueron sometidos a dos sesiones:

**1<sup>era</sup> sesión (adquisición):** Los animales se colocaron en el campo abierto con dos objetos idénticos durante un máximo de 12 min. y hasta que los animales hubieran explorado los objetos al menos durante 20 s. Los animales que durante estos 12 min. no fueron capaces de explorar los objetos un mínimo de 20 s, se excluyeron del experimento. Justo después de esta sesión los animales fueron inyectados i.p. con salino (0.9% NaCl) o nicotina 0.3 mg/kg

**2<sup>nda</sup> sesión (Test):** Se realizó al cabo de 1h de terminar la sesión de adquisición. Durante esta sesión, uno de los objetos de la sesión de adquisición fue sustituido por otro de diferente pero con la misma preferencia, y los animales se colocaron en el campo abierto durante 5 min.



La memoria de reconocimiento se evaluó calculando, en la 2<sup>nda</sup> sesión, la diferencia de tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar, dividido por el tiempo total de exploración de los dos objetos  $(N-F/N+F)*100$ . La exploración de los objetos se calculó midiendo el tiempo en que el ratón dirigía su nariz hacia el objeto a una distancia  $\leq 2\text{cm}$  o tocando con la nariz. Pasar alrededor del objeto o ponerse encima de él no se consideró exploración.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido caracterizar el papel como interfaz genético en trastornos de ansiedad y abuso de sustancias de genes clave en procesos de neurodesarrollo y plasticidad y en la funcionalidad de los sistemas de neurotransmisión. Por ello el trabajo experimental se organiza en dos fases, que comparten la utilización de modelos murinos genéticamente modificados como aproximación experimental: un modelo de sobreexpresión de *NTRK3*, y otro de sobreexpresión de un cluster genético que agrupa las subunidades  $\beta 4$ ,  $\alpha 3$ , y  $\alpha 5$  de nAChRs. Dado que intentamos comprender los mecanismos implicados en la comorbilidad entre el abuso de drogas y los trastornos de ansiedad, pero también delimitar las regiones cerebrales responsables de la co-ocurrencia de estos dos trastornos se han realizado estudios conductuales, farmacológicos con drogas de abuso como morfina o nicotina, y experimentos de caracterización histológica y molecular.

Los resultados que presentamos en los dos modelos experimentales objeto de estudio, reflejan niveles diferentes de caracterización debido a que: 1/ el papel funcional de cada una de las proteínas es diferente y 2/ la caracterización basal previamente realizada en el laboratorio era diferente. Así, mientras que el modelo de sobreexpresión del receptor de la NT-3, TgNTRK3, había sido validado anteriormente como modelo de trastorno de ansiedad (Dierssen et al., 2006), en el caso del modelo de sobreexpresión de los nAChRs ha sido necesario realizar en una primera fase, la validación conductual (isomorfismo) y farmacológica.

## **1. CARACTERIZACIÓN DE LA CO-MORBILIDAD DE TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y ABUSO DE SUSTANCIAS EN EL MODELO DE SOBREPRESIÓN DE NTRK3**

Existen varias familias de genes que podrían explicar la comorbilidad entre los trastornos de ansiedad y el abuso de drogas. Los factores neurotróficos son buenos candidatos, ya que participan en las adaptaciones producidas frente a estímulos emocionales, y frente a la adicción a las drogas. Pero también facilitan durante el neurodesarrollo cambios en plasticidad sináptica y trofismo neuronal, que finalmente podrían promover alteraciones estructurales y funcionales en regiones cerebrales clave en los trastornos de ansiedad y de abuso de sustancias. En

nuestro laboratorio disponemos de un modelo transgénico (TgNTRK3) con sobreexpresión del receptor de alta afinidad para NT-3, TrkC, que había sido validado en trabajos previos como modelo de trastorno de pánico (Dierssen et al., 2006).

### **1.1. Caracterización morfológica y funcional de estructuras clave en la co-morbilidad: El LC**

Una de las características patognomónicas del trastorno de pánico es el exceso de actividad noradrenérgica que se produce durante los ataques de pánico. De hecho, estudios iniciales mediante técnicas de recuento estereológico mostraban un incremento de la densidad celular en la región troncoencefálica, específicamente a nivel del LC en el transgénico TgNTRK3 (Dierssen et al., 2006). Dado el papel fundamental que esta estructura juega a su vez en la dependencia opiácea, era necesario profundizar en la caracterización de este fenotipo.

#### ***1.1.1. Caracterización morfométrica del LC en el ratón TgNTRK3***

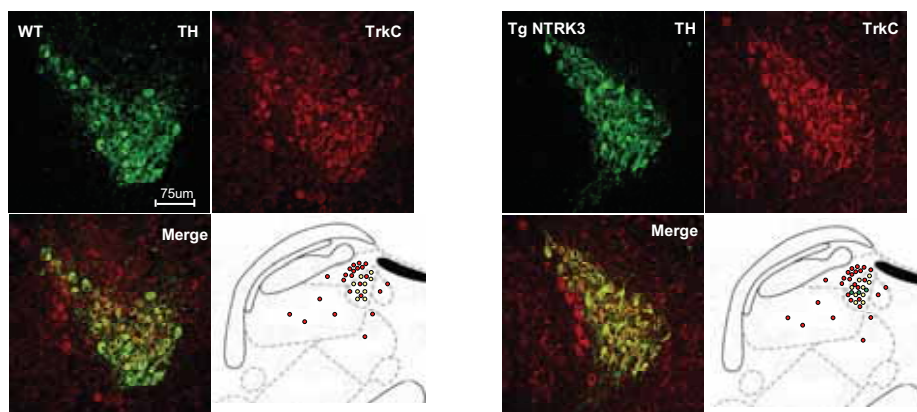
Utilizando la técnica de Cavalieri, no se observaron diferencias significativas en el volumen del LC. Posteriormente procedimos a la caracterización de la densidad celular en diferentes subregiones del núcleo, estudiando separadamente la población noradrenérgica, tirosina hidroxilasa (TH) positiva y aquellas subpoblaciones neuronales que presentaban doble marcaje con TH y TrkC.

#### ***1.1.2. El TgNTRK3 muestra un incremento de neuronas TH/TrkC positivas en el LC***

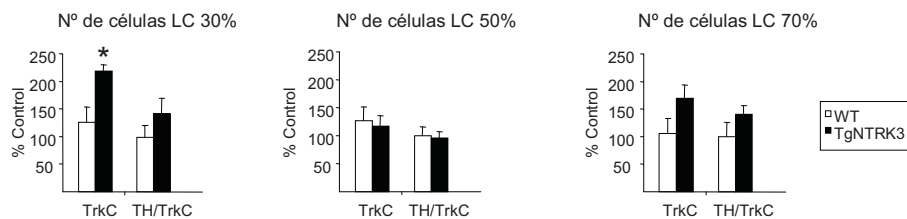
Se sabe que diferentes porciones del LC proyectan hacia diferentes estructuras (Szot et al., 2006) y a su vez reciben aferencias procedentes de regiones cerebrales diferentes. Por ello, analizamos secciones obtenidas a diferentes niveles del LC (30%, 50%, 70%, Figura 1), siguiendo el método de (Hoogendijk et al., 1999). El análisis estadístico reveló un incremento significativo de la densidad de células noradrenérgicas, con inmunoreactividad positiva para TH en el TgNTRK3 en la porción más rostral (30%) del LC (incremento del 24.9%;  $F(1,12) = 3.75$ ,  $P = 0.05$ , ANOVA de una vía). Sin embargo, este incremento no se observó en el nivel intermedio (50%) del LC. A nivel caudal (70%), el TgNTRK3 de nuevo mostró un

incremento de neuronas TH positivas si bien en esta subregión no alcanzó significación estadística. En el caso de las neuronas con doble inmunoreactividad positiva, TH/TrkC se observó un patrón similar aunque las diferencias no llegaron a ser significativas. Así, la densidad de neuronas que mostraron colocalización fue mayor en el TgNTRK3 en los niveles del 30% y del 70%, mientras que en la zona medial del LC no se observaron diferencias en las neuronas con doble marcaje.

(A)



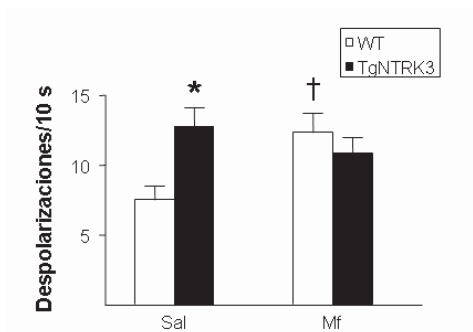
(B)



**Figura 1. Colocalización de neuronas TH/TrkC positivas en el LC.** (A) Microfotografías de fluorescencia de una región representativa del LC de animales controles (WT, panel izquierdo) y animales TgNTRK3 (panel derecho). La misma fotografía se obtuvo utilizando diferentes filtros. En la parte superior izquierda de la figura se muestra la inmunoreactividad de la TH (verde), mientras que en la parte superior derecha se muestra la inmunoreactividad para TrkC (rojo). En la parte inferior izquierda de la figura se muestra la colocalización de neuronas TH/TrkC del LC y en la parte inferior derecha se muestra un diagrama representativo de la colocalización de neuronas TH y TrkC positivas. (B) El número de neuronas TH/TrkC de animales controles (WT) y animales TgNTRK3 del LC a diferentes niveles en el plano rostro-caudal (30%, 50%, 70%) se muestra representado en diagramas de barras. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05.

**1.1.3. La sobreexpresión de NTRK3 incrementa la actividad basal de neuronas noradrenérgicas del LC y altera las adaptaciones funcionales producidas en este núcleo como consecuencia de la administración crónica de morfina**

Estudios electrofisiológicos previos en colaboración con el grupo del Dr. Joseba Pineda, de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) habían mostrado que la disregulación de los niveles de expresión del receptor de NT-3 (TrkC) producía cambios en la actividad basal del LC. El incremento de la actividad del LC, además de estar presente en los ataques de pánico, contribuye a la expresión del síndrome de abstinencia en ratones dependientes a la morfina (Kogan et al., 1992). Era por tanto necesario determinar si la hiperactividad de neuronas del LC durante la abstinencia a morfina era diferencial en el modelo TgNTRK3. Para ello se realizaron estudios electrofisiológicos, mediante registros extracelulares de célula única en cortes del troncoencéfalo que contenían LC, obtenidos a partir de cerebros de ratones controles y TgNTRK3. Los valores de actividad basal [despolarizaciones (spikes) por segundo] obtenidos en neuronas del LC de animales controles ( $0.75 \pm 0.1$ ) se encontraron dentro del rango de valores obtenidos previamente en cortes cerebrales de rata (Kogan et al., 1992). El síndrome de abstinencia a morfina, provocado *in vitro* en ratones controles, incrementó la actividad de las neuronas del LC (+73%,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía) en comparación con los valores obtenidos en el grupo control tratado con salino (Figura 2). Los valores obtenidos en los animales TgNTRK3 tratados con salino fueron significativamente superiores respecto a los obtenidos en animales controles ( $1.28 \pm 0.1$  Hz,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía. Figura 2). Sin embargo, durante el síndrome de abstinencia a morfina, los animales TgNTRK3 no mostraron incrementos en la frecuencia de descargas respecto al grupo transgénico/salino, por lo que los valores alcanzados fueron similares a los obtenidos en el grupo abstinentes de animales control (Figura 2). Mientras que el patrón de respuesta en los ratones control fue el esperado, en el transgénico, la respuesta paradójica obtenida sugiere que la sobreexpresión del receptor TrkC es capaz de modificar la actividad del LC en condiciones basales, llegando a niveles de descarga similares a las producidas durante la abstinencia a morfina en animales control, pero en cambio impide las adaptaciones funcionales producidas durante la dependencia a la morfina.



**Figura 2. Electrofisiología de neuronas del LC.**

Actividad de neuronas del LC en cortes cerebrales de animales controles (WT) y TgNTRK3: 1) tratados con salino (Sal), 2) abstinentes a morfina (Mf). La gráfica muestra la actividad neuronal contabilizada como despolarizaciones por cada 10 s. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \* $P < 0.05$ . Diferencias entre grupos de tratamiento † $P < 0.05$

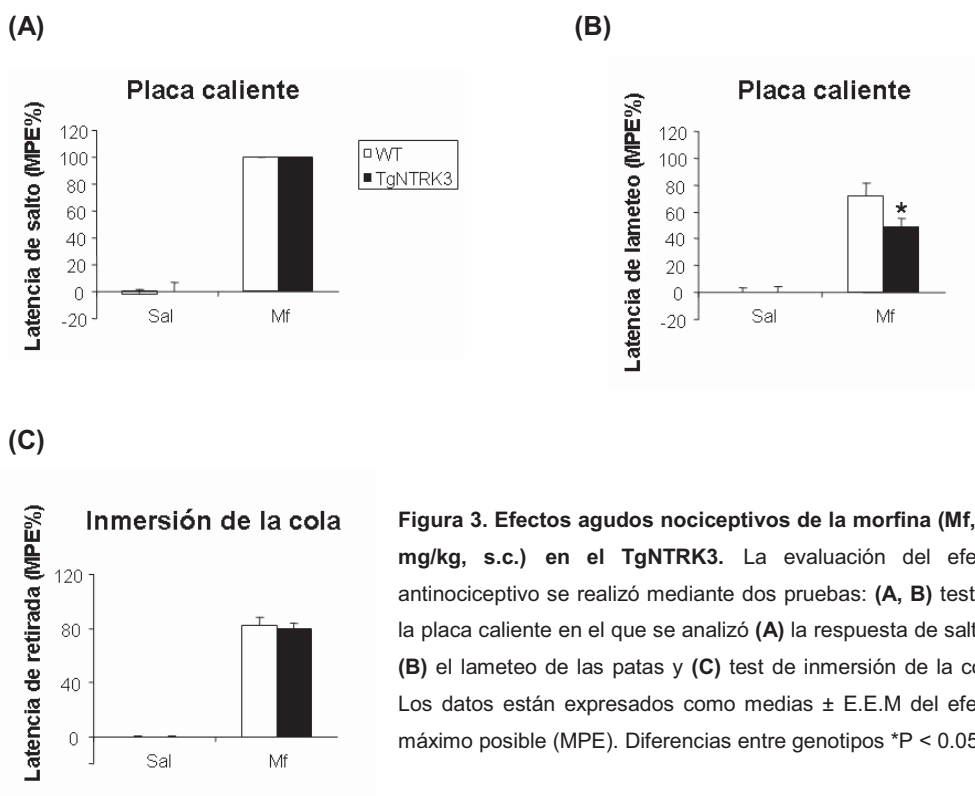
## 2. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL PERFIL DE RESPUESTA A LA MORFINA EN EL RATÓN TGNTRK3

### 2.1. El ratón TgNTRK3 mostró una menor sensibilidad a los efectos agudos de la morfina

Los efectos agudos de la morfina se evaluaron registrando la acción analgésica y la modificación de actividad locomotora (Figura 3). La evaluación de la acción analgésica de morfina en el test de la placa caliente no mostró diferencias cuando se comparó la latencia de salto (Figura 3A). Sin embargo, la respuesta de lameteo de las patas (Figura 3B), que es más sensible a agentes analgésicos y se considera una medida más precisa de potencia antinociceptiva en roedores, mostró una reducción significativa del efecto antinociceptivo producido por la administración aguda de morfina en el TgNTRK3 (control =  $65.69 \pm 5.92$ ; TgNTRK3 =  $49.15 \pm 5.62$ ,  $F(1,47) = 4.08$ ,  $P < 0.05$ ; ANOVA de una vía). No se observaron diferencias de genotipo en los animales tratados con salino ni en la respuesta de salto (control =  $-1.55 \pm 3.53$ ; TgNTRK3 =  $0.00 \pm 4.05$ ,  $F(1,56) = 0.08$ , n.s., ANOVA de una vía) ni de lameteo (control =  $0.00 \pm 3.52$ ; TgNTRK3 =  $0.00 \pm 7.54$ ,  $F(1,56) = 0.00$ , n.s., ANOVA de una vía) indicando que el umbral nociceptivo es similar en ambos genotipos. El test de inmersión de la cola (Figura 3C) de nuevo corroboró la similitud de respuesta en ambos genotipos en condiciones basales (control =  $0.00 \pm 0.60$ ; TgNTRK3 =  $0.00 \pm 0.56$ ,  $F(1,69) = 0.00$ , n.s., ANOVA de una vía). Sin embargo, al igual que sucedía con el parámetro menos sensible en el test de la placa caliente, la latencia de salto, no se observaron diferencias significativas entre

genotipos en los efectos antinociceptivos de la administración aguda de morfina (control =  $75.63 \pm 3.93$ ; TgNTRK3 =  $71.85 \pm 4.16$ ,  $F(1,48) = 0.44$ , n.s., ANOVA de una vía).

El estudio de la actividad locomotora (Figura 4A) no mostró diferencias entre genotipos en condiciones basales (control =  $269.84 \pm 30.38$ ; TgNTRK3 =  $303.80 \pm 22.47$ ,  $F(1,55) = 0.73$ , n.s., ANOVA de una vía). Por otra parte, la administración de morfina produjo un incremento de la actividad locomotora que alcanzó niveles similares entre ambos genotipos, (control =  $415.54 \pm 56.84$ ; TgNTRK3 =  $371.37 \pm 57.34$ ,  $F(1,48) = 0.29$ , n.s., ANOVA de una vía). El ANOVA de dos vías no mostró interacción entre genotipo y tratamiento ( $F(1,106) = 0.81$ , n.s.).



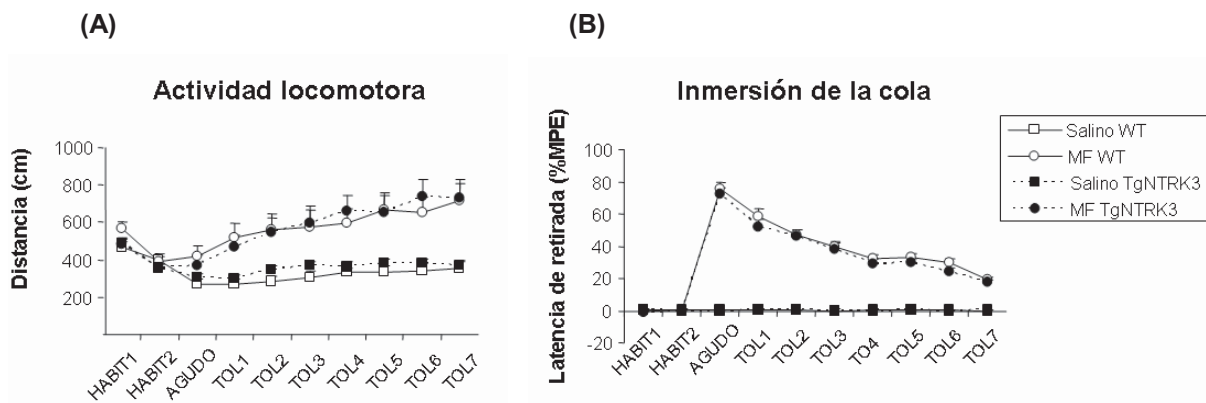


## **2.2. La sensibilización locomotora inducida por la morfina y el desarrollo de la tolerancia a su efecto antinociceptivo no se modificaron por la sobreexpresión de TrkC**

La actividad locomotora se registró después de la inyección con salino o morfina, y durante las primeras horas de la fase de luz del ciclo luz-oscuridad. Los animales tratados con salino de ambos genotipos, mostraron una disminución de la actividad total en las primeras sesiones (sesión de habituación (HABIT)1 =  $470.44 \pm 27.01$ ; HABIT2 =  $397.31 \pm 36.57$ ; administración aguda (AGUDO) =  $269.84 \pm 30.34$ ,  $F(2,93) = 10.34$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de una vía), indicando una habituación al aparato, seguido por un nivel de actividad locomotora estable a lo largo de las sesiones (Figura 4A).

Los niveles de actividad mostraron un patrón de normalidad respecto a lo observado para esta cepa durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad en estudios previos realizados en nuestro laboratorio. El análisis estadístico reveló que la administración crónica de morfina producía sensibilización en la actividad locomotora, tanto en los animales controles ( $F(1,56) = 11.23$ ,  $P = 0.001$ , ANOVA de una vía) como en los TgNTRK3 ( $F(1,47) = 9.84$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía) cuando se compararon con el grupo salino (Figura 4A).

El desarrollo de tolerancia a la acción antinociceptiva de la morfina se monitorizó a lo largo de 7 días, sometiendo a los animales a dos administraciones diarias de morfina (10 mg/kg) y evaluando posteriormente la antinocicepción mediante el test de inmersión de la cola (Figura 4B). Tanto los animales TgNTRK3 como los controles mostraron una pérdida progresiva del efecto antinociceptivo a lo largo de las sesiones en el test de inmersión de cola, por lo que la curva de tolerancia fue similar en ambos genotipos (%MPE;  $F(1,47) = 0.48$ , n.s., ANOVA de medidas repetidas). El grupo salino tampoco mostró diferencias entre genotipos durante los 7 días de experimento ( $F(1,68) = 0.00$ , n.s., ANOVA de medidas repetidas). El análisis estadístico mediante el ANOVA de medidas repetidas de dos vías no mostró interacción entre genotipo y tratamiento ( $F(1,115) = 0.66$ , n.s., ANOVA de medidas repetidas) a lo largo de los días.



**Figura 4. Desarrollo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de la morfina y sensibilización a la actividad locomotora en el TgNTRK3.** (A) Actividad locomotora medida como distancia recorrida en centímetros (cm). (B) Respuesta nociceptiva evaluada como porcentaje del efecto máximo posible (%MPE). Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M.

### 2.3. El síndrome de abstinencia no se modificó en el TgNTRK3 cuando la dependencia se indujo mediante dosis crecientes de morfina

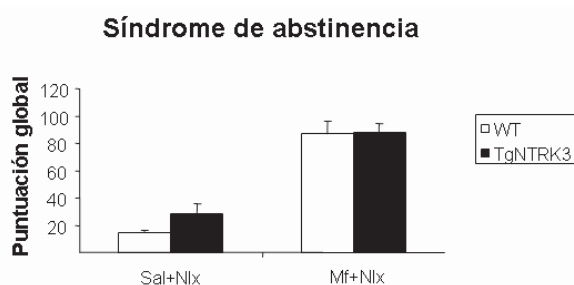
El síndrome de abstinencia se estudió utilizando dos protocolos de administración de morfina tal y como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. En el primer caso, se examinaron los signos de abstinencia en animales controles y TgNTRK3 (Figura 5) después de 6 días de administración de dosis crecientes de morfina, y tras desencadenar la abstinencia mediante una inyección subcutánea de naloxona dos horas después de la última inyección de morfina. Tanto los animales controles como los TgNTRK3 mostraron los signos característicos del síndrome de abstinencia a morfina, incluyendo sacudidas, temblor de patas, piloerección, saltos, y otras conductas (Figura 5A). No se observaron diferencias en la puntuación global obtenida en ambos genotipos (control =  $86.95 \pm 9.00$ ; TgNTRK3 =  $87.72 \pm 6.73$ ,  $F(1,36) = 0.00$ , n.s., ANOVA de una vía; Figura 5B). Los animales tratados con salino + naloxona no presentaron respuesta apreciable, y tampoco mostraron diferencias entre genotipos, aunque se observó una tendencia a una mayor respuesta en los animales TgNTRK3 para algunos de los signos observados de forma que la puntuación global mostró una tendencia no significativa a ser superior (control =  $14.73 \pm 1.73$ ; TgNTRK3 =  $27.81 \pm 7.63$ ,  $F(1,40) = 2.56$ , n.s., ANOVA de una vía).

(A)

Sal+Nlx	WEIGHT	JUMPS	PAW TREMOR	WET DOG SHAKES	SNIFFINGS	TREMOR	PTOSIS	DIAPHORREA	PILOERECTORIA	MASTICATION
WT	6.04 ± 0.71	1.64 ± 0.79	2.75 ± 1.46	1.30 ± 0.38	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.53 ± 0.23	0.30 ± 0.18	1.85 ± 0.60	1.13 ± 0.34
TgNTRK3	6.04 ± 0.97	10.29 ± 5.41	3.68 ± 1.57	1.36 ± 0.23	0.57 ± 0.39	1.09 ± 0.49	0.61 ± 0.31	0.41 ± 0.18	3.41 ± 0.83	1.84 ± 0.54
Chi-Square	0.07	0.2	0.02		0.17	0.14	2.22	0.66	2.65	0.77
P-value	0.79	0.66	0.89		0.68	0.71	0.14	0.42	0.1	0.38

Mf+Nlx	WEIGHT	JUMPS	PAW TREMOR	WET DOG SHAKES	SNIFFINGS	TREMOR	PTOSIS	DIAPHORREA	PILOERECTORIA	MASTICATION
WT	-3.01 ± 9.90	46.07 ± 7.68	15.11 ± 2.90	2.94 ± 0.92	4.69 ± 1.25	2.67 ± 0.88	2.41 ± 0.68	0.25 ± 0.15	8.50 ± 0.21	6.67 ± 0.42
TgNTRK3	6.16 ± 1.32	39.58 ± 4.99	13.30 ± 2.90	2.16 ± 0.48	5.00 ± 1.65	2.76 ± 0.75	3.79 ± 0.68	0.71 ± 0.21	8.29 ± 0.49	6.95 ± 0.29
Chi-Square	0.02	0.24	0.35	0.05	0.05	0.12	1.83	2.95	0.18	0.02
P-value	0.90	0.63	0.55	0.83	0.82	0.73	0.18	0.09	0.67	0.89

(B)

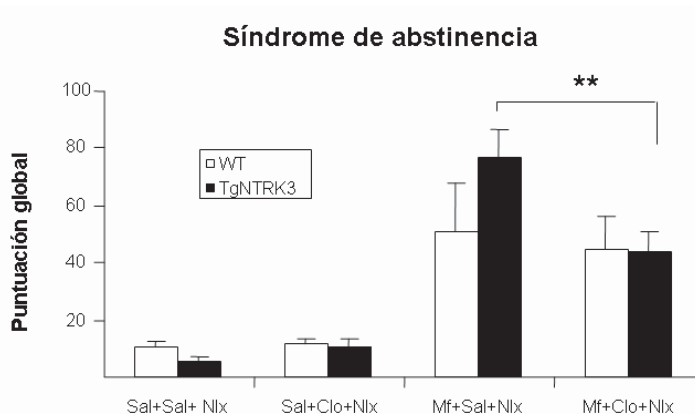


**Figura 5. Puntuación de los signos de la abstinencia a morfina. (A)** Puntuación global de los signos de abstinencia en los animales controles (WT) y transgénicos (TgNTRK3) tras administración de salino y naloxona (Sal+Nlx) y tras abstinencia a morfina (Mf+Nlx). **(B)** Puntuación global de todos los signos. Los datos están expresados como medias ± E.E.M.

## 2.4 Efecto de la clonidina sobre la respuesta conductual del TgNTRK3 durante la abstinencia a morfina tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de la droga

Para determinar el efecto de clonidina sobre síndrome de abstinencia a morfina, éste fue inducido mediante el mismo protocolo de administración que en el apartado anterior, y se cuantificaron los signos de la abstinencia en animales tratados o no con clonidina (Figura 6). Cuando se analizó la puntuación global obtenida de la suma de los signos de la abstinencia no se observaron diferencias significativas entre genotipos en los grupos tratados con salino+salino+naloxona y en los salino+clonidina+naloxona, pero sí que se observó una mayor puntuación en los TgNTRK3 respecto a los controles, en los grupos tratados con morfina+salino+naloxona. En los grupos tratados con morfina+clonidina+naloxona se observó una disminución de los síntomas de la abstinencia en ambos genotipos cuando se comparaban con los morfina+salino+naloxona, que únicamente alcanzó

significación estadística en TgNTRK3 ( $F(1,14) = 8.78, P < 0.01$ , ANOVA de una vía).



**Figura 6. Respuesta conductual al efecto de la clonidina en el TgNTRK3 tras abstinencia a morfina.** La gráfica muestra la puntuación global obtenida de la suma de todos los síntomas observados. El eje de abscisas muestra los diferentes tratamientos: salino+salino+naloxona (Sal+Sal+Nlx), salino+clonidina+naloxona (Sal+Clo+Nlx), morfina+salino+naloxona (Mf+Sal+Nlx), morfina+clonidina+naloxona (Mf+Clo+Nlx). Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre tratamientos  $**P < 0.01$ .

## 2.5. Efecto de la clonidina en la actividad del LC durante la abstinencia a morfina tras desarrollar dependencia mediante dosis crecientes de la droga

Con el fin de averiguar si los autorreceptores  $\alpha_2$  adrenérgicos estaban alterados en el TgNTRK3 se realizó una curva dosis-respuesta de clonidina en secciones del LC de ratones abstinentes. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la curva dosis-respuesta (Figura 7A) de ambos genotipos en los diferentes tratamientos, ni tampoco en la concentración eficaz 50 ( $CE_{50}$ ) (Figura 7B). Sin embargo se observó una tendencia a una menor inhibición del LC en los animales TgNTRK3 respecto a los controles cuando se trataron con salino más clonidina, que podría indicar una cierta desensibilización de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en condiciones basales. Tras abstinencia a morfina los animales control mostraron una disminución del efecto inhibitorio de la clonidina respecto a los tratados con salino, mientras que en los TgNTRK3 se observó un incremento de los efectos inhibitorios de la clonidina respecto a sus salinos, sugiriendo una desensibilización de los

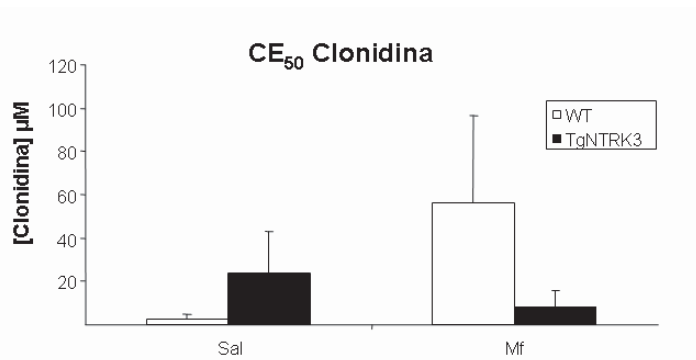
receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos en animales controles tras abstinencia a morfina y paradójicamente una hipersensibilización de estos receptores en los animales TgNTRK3.

(A)

### % Inhibición de neuronas del LC

	WT			TgNTRK3		
	Sal	Mf		Sal	Mf	
100 nM	25.25 ± 5.63	18.92 ± 5.15	↓	23.89 ± 6.95	23.43 ± 6.97	≈
1 $\mu$ m	42.5 ± 7.6	35 ± 11.1	↓	35.79 ± 10.2	49.37 ± 9.37	↑
10 $\mu$ m	66.61 ± 11.16	66.48 ± 16.09	≈	53.85 ± 12.6	73.18 ± 11.4	↑
100 $\mu$ m	77.25 ± 15.21	58.33 ± 25.00	↓	74.06 ± 17.5	81.78 ± 7.64	↑
1 mM	100 ± 0.00	100 ± 0.00	=	94.55 ± 5.46	100 ± 0.00	↑
10 mM	100 ± 0.00	100 ± 0.00	=	100 ± 0.00	100 ± 0.00	=

(B)



**Figura 7. Efecto de la clonidina en el TgNTRK3 tras abstinencia a morfina. (A)** Porcentaje de inhibición de neuronas del LC tras la administración de dosis crecientes de clonidina (100 nM, 1  $\mu$ m, 10  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 1 mM, 10 mM) en animales controles (WT) y TgNTRK3 tratados con salino (Sal) o abstinentes a morfina (Mf). La tabla muestra, mediante flechas, el incremento o la disminución del porcentaje de inhibición de neuronas del LC entre los animales tratados con salino y los abstinentes de cada genotipo. **(B)** Concentración eficaz 50 (CE<sub>50</sub>) expresada en concentración de clonidina micromolar en animales tratados con salino (Sal) y en animales abstinentes a morfina (Mf). Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M.

## 2.6. El síndrome de abstinencia se intensificó en el TgNTRK3 cuando la dependencia se indujo mediante dosis constantes de morfina

Con la finalidad de descartar un posible efecto umbral en los signos de abstinencia observados en animales controles y transgénicos, se utilizó un régimen de administración alternativo, en el que se examinaron los signos de la abstinencia a morfina en animales tratados con una dosis estable más baja en administración crónica (Figura 8). Cuando se comparó con lo observado en los animales tratados con dosis crecientes de morfina, cuando se utilizó el régimen de dosis constante de la droga el síndrome de abstinencia fue en general menos intenso en ambos genotipos. Sin embargo, se observó un incremento de la respuesta en algunos signos de abstinencia en los animales TgNTRK3 (Figura 8A), de forma que la puntuación global (Figura 8B) mostró un diferencia significativa entre genotipos, siendo la puntuación de los animales TgNTRK3 dos veces superior a la de los controles (control =  $16.57 \pm 2.56$ ; TgNTRK3 =  $33.17 \pm 6.23$ ,  $F(1,16) = 6.07$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía). De nuevo, no se observaron diferencias significativas tras el tratamiento con salino + naloxona al igual que sucedía en el experimento anterior (control =  $4.41 \pm 0.95$ ; TgNTRK3 =  $5.90 \pm 1.18$ ,  $F(1,21) = 0.98$ , n.s., ANOVA de una vía).

(A)

Sal+Nlx	JUMPS	PAW TREMOR	WET DOG SHAKES	SNIFFINGS	TREMOR	PTOSIS	DIAHORREA	PILOERECTION	MASTICATION
WT	0.12± 0.12	0.76± 0.28	0.54± 0.24	0.00± 0.00	0.34± 0.25	0.69± 0.32	0.00± 0.00	1.27± 0.77	0.69± 0.21
TgNTRK3	1.12± 0.95	1.08± 0.21	1.09± 0.48	0.00± 0.00	0.30± 0.20	1.20± 0.62	0.00± 0.00	0.00± 0.00	0.30± 0.20
Chi-Square	0.81	1.84	6.52	0.00	0.03	0.12	0.00	2.53	1.63
P-value	0.37	0.17	0.01	1.00	0.85	0.73	1.00	0.11	0.20

Mf+Nlx	JUMPS	PAW TREMOR	WET DOG SHAKES	SNIFFINGS	TREMOR	PTOSIS	DIAHORREA	PILOERECTION	MASTICATION
WT	2.40± 1.59	3.23± 1.34	2.78± 0.46	0.83± 0.83	0.83± 0.36	2.16± 0.71	0.33± 0.22	1.17± 0.99	2.83± 0.58
TgNTRK3	9.68± 2.84	21.03± 7.09	5.00± 1.49	0.00± 0.00	0.75± 0.60	0.60± 0.460	0.60± 0.24	0.60± 0.60	2.25± 0.81
Chi-Square	5.65	7.29	0.63	1.11	0.89	2.76	0.66	0.50	0.78
P-value	0.02	0.00	0.27	0.29	0.34	0.09	0.42	0.48	0.37

(B)

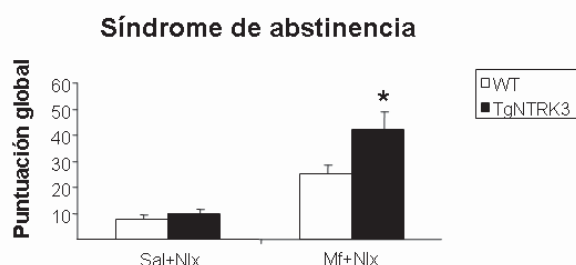
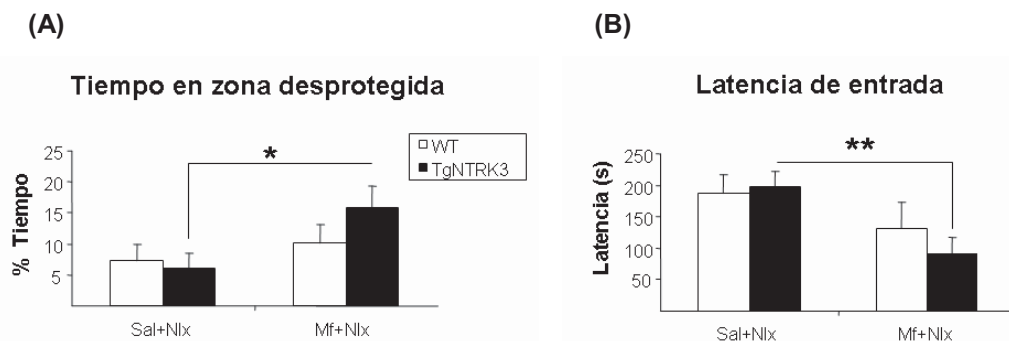


Figura 8. Puntuación de los signos de la abstinencia a morfina. (A) Puntuación de cada uno de los signos observados en los animales controles (WT) y transgénicos (TgNTRK3) en condiciones basales (Sal+Nlx) y tras abstinencia a morfina (Mf+Nlx). (B) Puntuación global de todos los signos. Los datos están expresados como medias ± E.E.M. Diferencias entre genotipos \* $P < 0.05$ .

## 2.7. Modificaciones en el comportamiento ansioso en el TgNTRK3 durante la abstinencia a morfina

El síndrome de abstinencia se ha relacionado con un incremento de la ansiedad en humanos y ratones (Schulteis et al., 1998). Por ello evaluamos la respuesta conductual en el test del laberinto circular elevado (O-maze). El análisis estadístico mostró un incremento del tiempo de permanencia en la zona desprotegida durante el síndrome de abstinencia en los animales TgNTRK3 (Figura 9A), cuando se comparó con el observado tras el tratamiento con salino+naloxona (salino+naloxona =  $5.95 \pm 2.61$ ; morfina+naloxona =  $15.75 \pm 3.58$ ,  $F(1,20) = 5.02$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía). Este patrón de respuesta fue similar en los animales controles, si bien en éstos no alcanzó significación estadística (salino+naloxona =  $7.35 \pm 2.56$ ; morfina+naloxona =  $10.08 \pm 2.96$ ,  $F(1,21) = 0.49$ , n.s., ANOVA de una vía). Además, la latencia de entrada en las zonas desprotegidas (Figura 9B) disminuyó durante la abstinencia a morfina tanto en el TgNTRK3 (salino+naloxona =  $196.81 \pm 26.02$ ; morfina+naloxona =  $90.70 \pm 26.98$ ,  $F(1,20) = 8.00$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía) como en los animales controles, aunque en éstos lo hizo de forma no significativa (salino+naloxona =  $187.25 \pm 30.33$ ; morfina+naloxona =  $130.44 \pm 41.84$ ,  $F(1,20) = 1.27$ , n.s., ANOVA de una vía).



**Figura 9. Test del laberinto circular elevado (o-maze) durante abstinencia a morfina. (A)** Tiempo de permanencia en zona desprotegida (porcentaje, en condiciones basales (Sal+Nlx) y durante abstinencia a morfina (Mf+Nlx). **(B)** Latencia de entrada en zona desprotegida medida en segundos, en condiciones basales (Sal+Nlx) y durante abstinencia a morfina (Mf+Nlx). Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre tratamientos \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3. DISREGULACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA DE NT-3, BDNF Y SUS RECEPTORES TRKC Y TRKB DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA CON DOSIS CRECIENTES DE MORFINA Y DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA EN LOS RATONES TGNTRK3

Se ha propuesto que la regulación de la expresión de neurotrofinas y sus receptores inducida por la administración de opiáceos, se asocia a los cambios neuroadaptativos subyacentes a la dependencia de éstos. El objetivo de este experimento fue examinar si esta regulación se encontraba modificada en los ratones TgNTRK3, a la vista de las diferencias observadas en el síndrome de abstinencia. Los experimentos de hibridación in situ en secciones coronales de LC confirmaron el incremento de los niveles de mRNA de TrkC (Figura 10A) en los TgNTRK3 respecto a sus controles (Control =  $7.69 \pm 0.56$  vs. TgNTRK3 =  $10.56 \pm 1.00$ ,  $F(1,95) = 7.06$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía). Este incremento fue acompañado por un incremento en los niveles de mRNA de NT-3 (Figura 10A) (Control =  $1.46 \pm 0.09$ ; TgNTRK3 =  $1.99 \pm 0.12$ ,  $F(1,55) = 12.49$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía).

El tratamiento crónico con morfina y la inducción del síndrome de abstinencia modularon de forma diferencial el sistema NT-3/TrkC en animales controles y transgénicos. Los niveles de mRNA de NT-3 no mostraron alteraciones respecto a los observados en condiciones basales en los animales control ni después del tratamiento crónico con morfina, ni durante la abstinencia, (salino =  $1.46 \pm 0.09$ ; morfina crónica =  $1.65 \pm 0.11$ ; morfina + naloxona =  $1.92 \pm 0.22$ ,  $F(2,82) = 2.12$ , n.s., ANOVA de una vía). El mismo patrón se observó en los ratones TgNTRK3 (salino =  $1.99 \pm 0.12$ ; morfina crónica =  $2.36 \pm 0.21$ ; morfina + naloxona =  $2.09 \pm 0.18$ ,  $F(2,70) = 1.06$ , n.s., ANOVA de una vía). La comparación de ambos genotipos mostró un incremento en los niveles de NT-3 en los animales transgénicos tratados crónicamente con morfina (Control =  $1.65 \pm 0.11$  vs. TgNTRK3 =  $2.36 \pm 0.21$ ,  $F(1,35) = 10.09$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía) pero no después de la abstinencia (Control =  $1.92 \pm 0.23$ ; TgNTRK3 =  $2.09 \pm 0.18$ ,  $F(1,59) = 0.34$ , n.s., ANOVA de una vía).



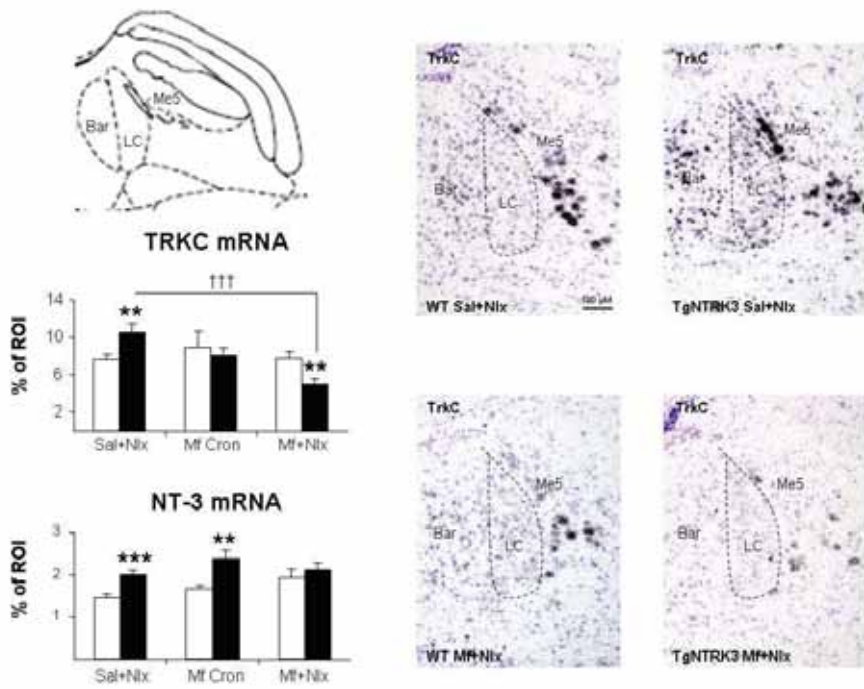
Los animales transgénicos mostraron una disminución de los niveles de mRNA de TrkC después del tratamiento crónico y durante la abstinencia (salino =  $10.55 \pm 1.00$ ; morfina crónica =  $8.07 \pm 0.85$ ; morfina + naloxona =  $4.92 \pm 0.68$ ; ANOVA de una vía,  $F(2,102) = 12.34$ ,  $P < 0.001$ ), mientras que ésta no se observó en los animales controles (salino =  $7.69 \pm 0.56$ ; morfina crónica =  $8.97 \pm 1.70$ ; morfina + naloxona =  $7.84 \pm 0.63$ ,  $F(2,127) = 0.51$ , n.s., ANOVA de una vía).

Cuando estudiamos la regulación del sistema BDNF/TrkB, contrariamente al incremento observado en los niveles de mRNA de TrkC, en el TgNTRK3 en condiciones basales, los niveles de TrkB (Figura 10B) fueron inferiores a los observados en los animales controles (Control =  $16.05 \pm 0.81$ ; TgNTRK3 =  $10.09 \pm 0.96$ ,  $F(1,53) = 22.11$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de una vía), pero no se observaron diferencias en los niveles de mRNA de BDNF (Figura 10B) (Control =  $5.92 \pm 1.00$ ; TgNTRK3 =  $4.28 \pm 0.30$ ,  $F(1,37) = 2.35$ , n.s., ANOVA de una vía).

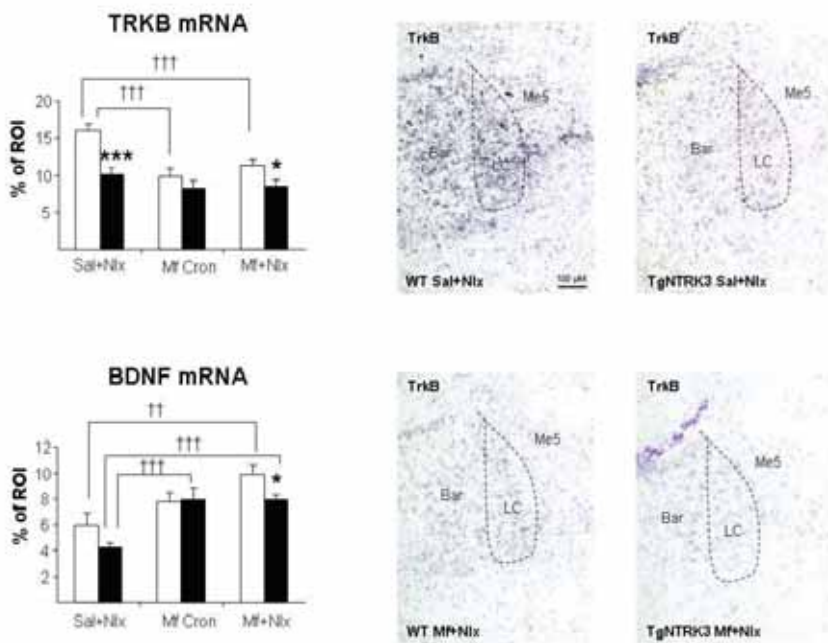
El tratamiento crónico con morfina modificó los valores de TrkB únicamente en los ratones control, de forma que se detectaron niveles similares en ambos genotipos (Control =  $9.86 \pm 1.12$ ; TgNTRK3 =  $8.25 \pm 1.03$ ,  $F(1,40) = 1.11$ , n.s., ANOVA de una vía). En consecuencia, la reducción en los niveles de TrkB respecto al grupo basal fue significativa en los animales controles (salino =  $16.05 \pm 0.81$ ; morfina crónica =  $9.86 \pm 1.12$ ; morfina + naloxona =  $11.18 \pm 0.93$ ,  $F(2,80) = 11.00$ ,  $P < 0.001$ ; ANOVA de una vía), pero no en los animales TgNTRK3 (salino =  $10.09 \pm 0.97$ ; morfina crónica =  $8.25 \pm 1.03$ ; morfina + naloxona =  $8.30 \pm 1.06$ ,  $F(2,81) = 1.02$ , n.s., ANOVA de una vía). Durante la abstinencia a morfina se observó una disminución significativa de los niveles de TrkB en el TgNTRK3 (Control =  $11.18 \pm 0.93$ ; TgNTRK3 =  $8.30 \pm 1.06$ ,  $F(1,66) = 4.19$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía).

Por el contrario, y tras el tratamiento crónico con morfina y durante la abstinencia la expresión de BDNF se modificó, tanto en los animales controles (salino =  $5.92 \pm 1.00$ ; morfina crónica =  $7.76 \pm 0.95$ ; morfina + naloxona =  $9.85 \pm 0.79$ ,  $F(2,73) = 5.51$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de una vía) como en los TgNTRK3 (salino =  $4.28 \pm 0.30$ ; morfina crónica =  $7.93 \pm 0.90$ ; morfina + naloxona =  $7.89 \pm 0.47$ ,  $F(2,68) = 9.59$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de una vía).

(A)



(B)

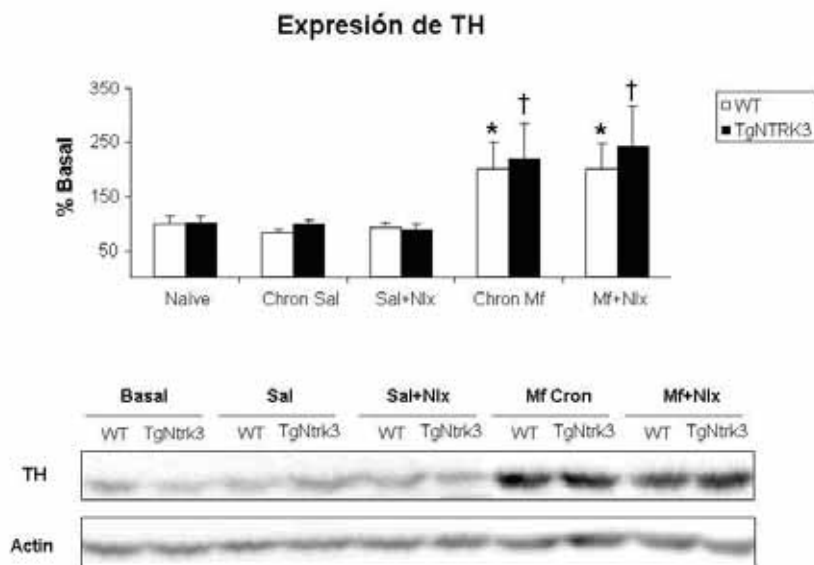


**Figura 10. Hibridaciones in situ de NT-3, BDNF, TrkC y TrkB después del tratamiento crónico con morfina y tras abstinencia.** (A) En el panel superior izquierdo, diagrama del locus coeruleus (LC), núcleo de Barrington (Bar) y núcleo trigeminal mesencefálico (Me5). Expresión de TrkC y NT-3 (panel inferior izquierdo). Los resultados se expresan como porcentaje de intensidad de la región de interés (% ROI) en los animales controles (barras blancas) y en los TgNTRK3 (barras negras). Fotografías de secciones coronales de 14  $\mu\text{m}$  (panel derecho) mostrando la expresión TrkC en el LC de animales controles y TgNTRK3. (B) Expresión de TrkB y BDNF (panel izquierdo) representado como porcentaje de intensidad de la región de interés (% ROI) en los animales controles (barras blancas) y en los TgNTRK3 (barras negras). Fotografías de secciones coronales de 14  $\mu\text{m}$  (panel derecho) mostrando la expresión TrkB en el LC de animales controles y TgNTRK3. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 \*\*\*P < 0.001. Diferencias entre tratamiento †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001

#### 4. LA DISREGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NTRK3 NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE TH EN EL LC

La TH es el enzima limitante de la síntesis de noradrenalina. Durante una exposición crónica a morfina, los niveles de TH incrementan en neuronas noradrenérgicas de rata y ratón, probablemente como mecanismo compensatorio a la inhibición neuronal del LC producida por la morfina (Lane-Ladd et al., 1997). Con el fin de examinar cómo la disregulación en los niveles de expresión de TrkC podría alterar la expresión de TH, se compararon los niveles de expresión de TH en el LC de animales controles y transgénicos sin tratar (basales), tratados con salino, salino + naloxona, morfina crónica, y morfina + naloxona (Figura 11). El análisis estadístico no mostró interacción entre genotipo y tratamiento ( $F(4,67) = 0.10$ , n.s., ANOVA de dos vías), y la expresión de TH fue similar entre genotipos en todos los tratamientos ( $F(1,67) = 0.47$ , n.s., ANOVA de dos vías), si bien los diferentes tratamientos mostraron diferentes niveles de expresión de TH ( $F(4,67) = 6.67$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de dos vías). Los animales tratados con morfina crónica mostraron un incremento importante en ambos genotipos cuando se compararon con los basales (basal =  $0.53 \pm 0.08$ ; morfina crónica =  $1.06 \pm 0.26$ ,  $F(1,15) = 5.82$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía, en animales controles, y basal =  $0.54 \pm 0.06$  morfina crónica =  $1.15 \pm 0.35$ ,  $F(1,15) = 5.11$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía, en animales TgNTRK3). El análisis estadístico también reveló un incremento en la expresión de TH durante el tratamiento con morfina + naloxona, cuando se compararon los niveles con los obtenidos en el grupo tratado con salino de cada genotipo (basal =

$0.53 \pm 0.08$  morfina + naloxona =  $1.06 \pm 0.25$ ,  $F(1,15) = 6.10$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía, en animales, en animales controles y, basal =  $0.54 \pm 0.06$ ; morfina + naloxona =  $1.27 \pm 0.41$ ,  $F(1,15) = 5.29$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía, en animales animales TgNTRK3).



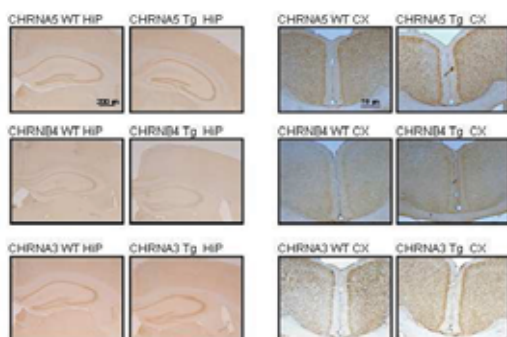
**Figura 11. Expresión de TH en el LC tras administración crónica de morfina y durante abstinencia.** Western blot de TH en bregma -4.60 al -7.56 de animales controles (barras blancas) y TgNTRK3 (barras negras). La actina se utilizó como control de carga de proteínas. Los animales sin tratar se consideraron el grupo basal. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. \* $P < 0.05$  cuando se compararon con el basal en los animales controles, y † $P < 0.05$  cuando se compararon con el basal en los animales TgNTRK3.

## 5. CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE SOBREPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 3$ , $\alpha 5$ y $\beta 4$ DE nAChRs

### 5.1. Caracterización del ratón TgCHRNA3/A5/B4

#### 5.1.1. Expresión de las subunidades $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , y $\beta 4$ en el ratón TgCHRNA3/A5/B4

Para poder interpretar correctamente posteriores resultados conductuales, era necesario analizar del patrón de expresión de las subunidades CHRNA3, CHRNA5, y CHRNB4 en diferentes regiones cerebrales mediante un análisis inmunohistoquímico (Figura 12). Los resultados mostraron un patrón de expresión de las subunidades CHRNA3, CHRNA5, y CHRNB4 similar entre animales controles y TgCHRNA3/A5/B4, descartando la existencia de expresión ectópica.

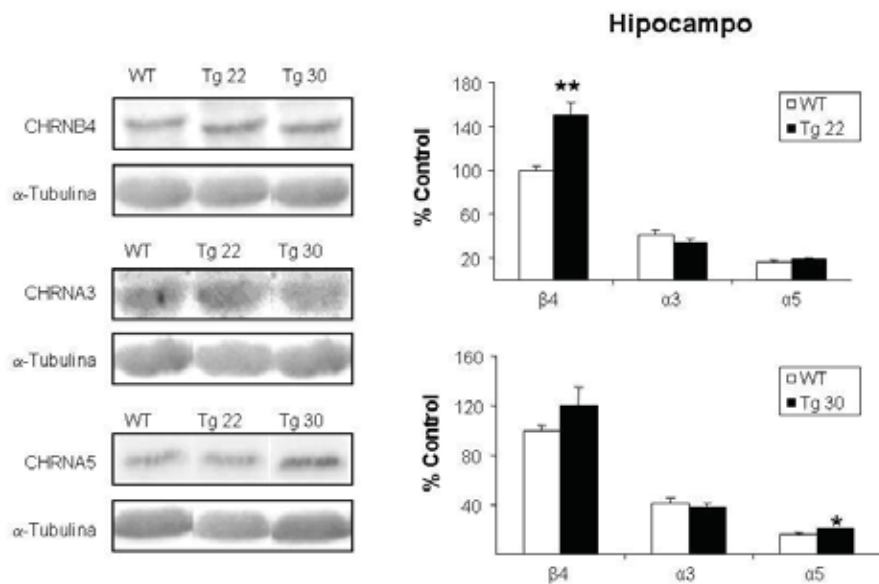


**Figura 12. Distribución de los nAChRs mediante inmunohistoquímica.** Patrón de expresión de los nAChRs  $\alpha 5$  (CHRNA5),  $\beta 4$  (CHRNB4),  $\alpha 3$  (CHRNA3), en algunas regiones representativas como el hipocampo (panel izquierdo) y la corteza cerebral (panel derecho) en animales controles (WT) y transgénicos (Tg)

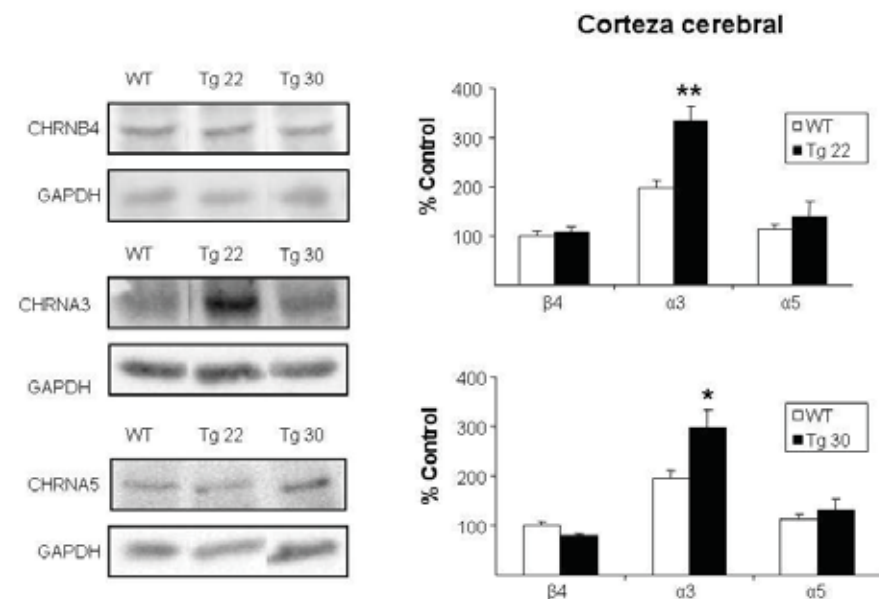
Con el fin de cuantificar los niveles se realizaron estudios de expresión mediante western blot (Figura 13). Ello era importante porque la caracterización del número de copias de las dos líneas transgénicas utilizadas (L22 y L30) mostró valores diferentes, que podían repercutir en los niveles finales de expresión de la proteína. La cuantificación de los niveles de expresión proteicos mostró un incremento de los niveles de expresión de la subunidad  $\beta 4$  en el hipocampo (Figura 13A) en los animales TgCHRNA3/A5/B4, siendo significativo solamente en la L22 (20%,  $F(1,6) = 11.77$ ,  $P = 0.01$ , ANOVA de una vía). Aunque no se observaron diferencias en la expresión total de la subunidad  $\alpha 3$  en ninguna de las dos líneas, sí se detectó un ligero incremento de la expresión de  $\alpha 5$ , que fue significativo únicamente en los animales transgénicos de la L30 (15.21%,  $F(1,5) = 7.91$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía). En la corteza cerebral (Figura 13B) este incremento se observó en la expresión

total de  $\alpha 3$ , tanto en los animales transgénicos de la L22 (25.98%,  $F(1,6) = 15.68$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía) como en los de la L30 (20.74%,  $F(1,5) = 7.21$ ,  $P = 0.05$ , ANOVA de una vía). También se observó una tendencia a incrementar la expresión de  $\alpha 5$  en los TgCHRNA3/A5/B4, pero sin llegar a ser significativa, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión total de  $\beta 4$  de la corteza cerebral.

(A)



(B)



**Figura 13. Cuantificación de los niveles de expresión de las subunidades de nAChRs  $\beta 4$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$ .** Expresión total de  $\beta 4$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  en (A), hipocampo y (B) la corteza cerebral. La figura muestra las bandas (panel izquierdo) correspondientes a las tres subunidades (de arriba a abajo) en los animales controles (WT), transgénicos de la L22 (Tg 22) y de la L30 (Tg 30). En la parte derecha de la figura están representadas las gráficas con el porcentaje de incremento respecto a los animales controles. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

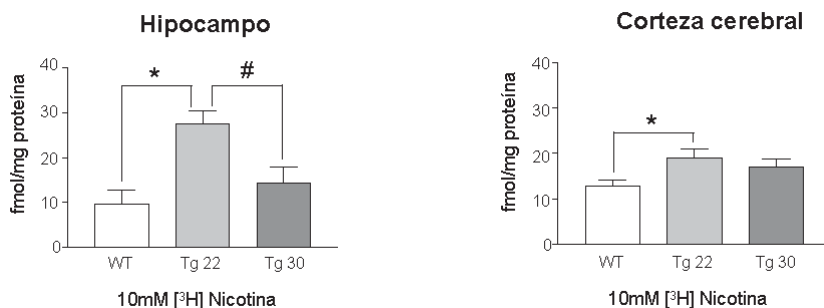
### **5.1.2. El TgCHRNA3/A5/B4 presenta un incremento en los sitios de fijación para nicotina**

La expresión de nAChRs de animales controles y TgCHRNA3/A5/B4 se estudió mediante estudios de fijación con radioligandos utilizando [ $^3$ H]nicotina (Figura 14A). El estudio se realizó por separado en las dos líneas de transgénicos.

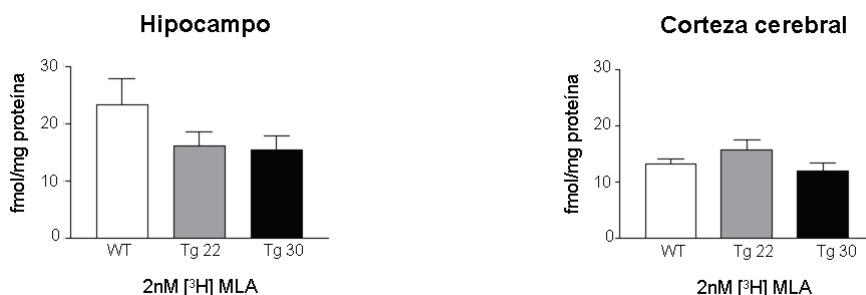
En membranas de hipocampo se observó un incremento de la fijación de [ $^3$ H]nicotina en el transgénico de la L22 respecto al control y al transgénico de la L30 (F (2, 21) = 8.23, P < 0.005, ANOVA de una vía). Así, el número de sitios de fijación en el hipocampo triplicaba el de los animales controles (WT =  $9.62 \pm 3.16$  fmol/mg proteína; Tg22 =  $27.42 \pm 2.88$  fmol/mg proteína; P < 0.01, ANOVA de una vía) y duplicaba el de los transgénicos de la L30 (Tg30 =  $14.28 \pm 3.58$  fmol/mg proteína; P < 0.01, ANOVA de una vía). En membranas de la corteza cerebral se observó un incremento del número de sitios de fijación para nicotina en los animales transgénicos de la L22, cuando estos se compararon con los controles (F (2, 21) = 3.39, P < 0.05, ANOVA de una vía). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los animales controles y transgénicos de la L30, ni tampoco entre la L22 y la L30 (Tg30 =  $17.12 \pm 1.63$  fmol/mg proteína), aunque en ambas líneas se observó un ligero incremento respecto a los animales controles.

El nº de sitios de fijación para la subunidad  $\alpha 7$  se estudió en membranas del hipocampo y de la corteza cerebral mediante el binding del antagonista selectivo [ $^3$ H] MLA (Figura 14B). Los resultados no mostraron diferencias en la expresión de estos receptores entre animales controles, transgénicos de la L22, y de la L30, en ninguna de las dos regiones estudiadas.

(A)



(B)



**Figura 14. Ensayos de binding.** (A) Estudios de fijación de nAChRs de transgénicos de la L22 (Tg 22), de la L30 (Tg 30) y controles (WT) en membranas de hipocampo y corteza cerebral en presencia de 10 mM [<sup>3</sup>H] nicotina. (B) Estudios de fijación de nAChRs  $\alpha 7$  en membranas de hipocampo y corteza cerebral en presencia de 2nM [<sup>3</sup>H] MLA. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre WT y Tg 22 \*P < 0.05, y entre Tg 22 y Tg 30 #P < 0.05.

## 5.2. Caracterización conductual del ratón TgCHRNA3/A5/B4

### 5.2.1 El TgCHRNA3/A5/B4 no muestra alteraciones neurológicas significativas

El protocolo de SHIRPA (tabla 1A), que permite la detección de alteraciones de la respuesta del sistema nervioso autónomo, y cambios conductuales y neurológicos (Rogers et al., 1997; Nolan et al., 2000), no mostró diferencias en las medidas somatométricas (peso y tamaño corporal), ni tampoco en la mayoría de las pruebas neurológicas como el reflejo prensil, la geotaxia negativa, la orientación táctil, la respuesta de alcance, la capacidad visual, la respuesta de sobresalto, el enroscamiento, el reflejo de enderezamiento, el reflejo corneal, o la respuesta de escape. Tampoco se observaron diferencias en comportamientos como la



respuesta de mordisco o la piloerección. Sin embargo, en el TgCHRNA3/A5/B4 se observó una reducción significativa de la sensibilidad al pinchazo de la pata (Fisher Test,  $P < 0.05$ ) y una mejor respuesta del equilibrio (Fisher Test,  $P < 0.05$ , Tabla 1B)

(A)

**PRUEBAS NEUROSENSORIALES**

	WT (%)	TgCHRNA3/A5/B4 (%)	Fisher test
<i>Orientación táctil</i>			
0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.4839
1	2 (100.0)	0 (0.0)	
2	14 (48.3)	15 (51.7)	
<i>Pinchazo de pata</i>			
0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0155*
1	8 (36.4)	14 (63.6)	
2	8 (88.9)	1 (11.1)	
<i>Mordisco</i>			
0	7 (70.0)	3 (30.0)	0.2524
1	9 (42.9)	12 (57.1)	
<i>Respuesta de sobresalto</i>			
0	2 (66.7)	1 (33.3)	0.9999
1	14 (50.0)	14 (50.0)	
<i>Enroscamiento</i>			
0	14 (50.0)	14 (50.0)	0.9999
1	2 (66.7)	1 (33.3)	
<i>Respuesta de escape</i>			
0	1 (50.0)	1 (50.0)	0.9999
1	15 (51.7)	14 (48.3)	
<i>Piloerección</i>			
0	7 (58.3)	5 (41.7)	0.7758
1	8 (50.0)	8 (50.0)	
2	1 (33.3)	2 (66.7)	

(B)

**PRUEBAS SENSORIOMOTORAS**

		WT (%)	TgCHRNA3/A5/B4 (%)	Fisher test
<i>Equilibrio</i>				
	1	13 (68.4)	6 (31.6)	0.0218*
	2	0 (0.0)	5 (100.0)	
	3	3 (42.9)	4 (57.1)	
<i>Reflejo prensil</i>				
	1	15 (50.0)	15 (50.0)	0.9999
	2	1 (100.0)	0 (0.0)	
<i>Tracción</i>				
	0	6 (85.7)	1 (14.3)	0.0631
	1	5 (62.5)	3 (37.5)	
	2	5 (35.7)	9 (64.3)	
	3	0 (0.0)	2 (100.0)	
<i>Cordinación motora</i>				
	1	4 (0-15)	4 (0-5)	0.2692
	2	17 (10-47)	16 (7-49)	0.8492
	3	60 (8-60)	60 (12-60)	0.3824

**Tabla 1.** Estudio conductual general de animales TgCHRNA3/A5/B4 (n = 15) y controles (n = 16) de un mes de edad. **(A)** Protocolo Shirpa. Orientación táctil y pinchazo en la pata: 0 (no respuesta), 1 (movimiento suave), 2 (movimiento rápido). Mordisco: 0 (no muerde), 1 (muerde). Reflejo de sobresalto: 0 (no mueve la oreja), 1 (mueve la oreja). Enroscamiento: 0 (ausencia), 1 (presencia). Reflejo de respuesta a estímulo táctil: 0 (no response), 1 (escape). Piloerección: 0 (ausencia), 1 (poca presencia), 2 (presencia). **(B)** Pruebas sensoriomotoras. Equilibrio: 1 (no desplazamientos), 2 (se mueve del centro), 3 (llega al extremo). Reflejo prensil: 1 (cae), 2 (se mantiene agarrado). Tracción: 0 (no sube las patas), 1 (sube una pata), 2 (sube dos patas), 3 (llega al extremo de la percha). Coordinación motora: 1 (desplazamientos), 2 (latencia de caída (seg.)), 3 (latencia de llegada al extremo de la percha). Los datos están expresados en una tabla de contingencia y analizados con el test de Fisher \*P<0.05.

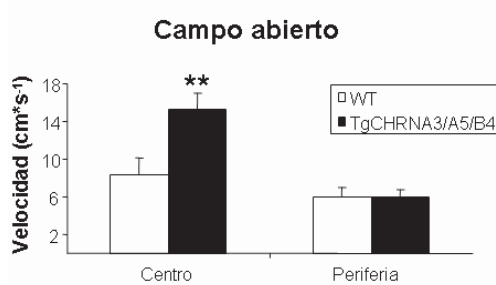
### 5.2.2. Alteraciones de la conducta relacionada con la ansiedad en los ratones TgCHRNA3/A5/B4

#### Test del campo abierto

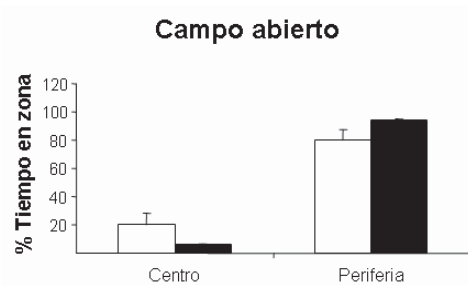
La exposición al campo abierto mostró diferencias conductuales en los animales transgénicos (Figura 15). El análisis estadístico reveló que los animales TgCHRNA3/A5/B4 incrementaban significativamente la velocidad de desplazamiento (Figura 15A) en el centro del aparato con respecto a sus controles

( $F(1,17) = 7.86$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía), mientras que este incremento no se observó en la periferia, un área mucho menos aversiva para los animales. Aunque no se observaron diferencias entre genotipos en el tiempo de permanencia (Figura 15B) y en la distancia recorrida (Figura 15C) en la periferia del aparato, sí que se vio una tendencia en los animales TgCHRNA3/A5/B4 a pasar menos tiempo en el centro del aparato. En conjunto, todos estos resultados indicaban un incremento leve de la conducta ansiosa en los animales TgCHRNA3/A5/B4.

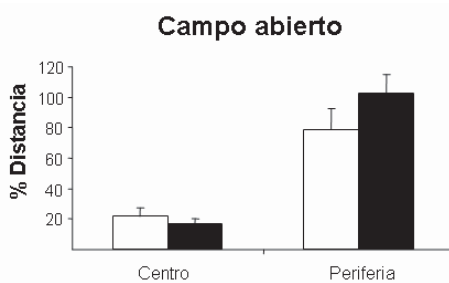
(A)



(B)



(C)

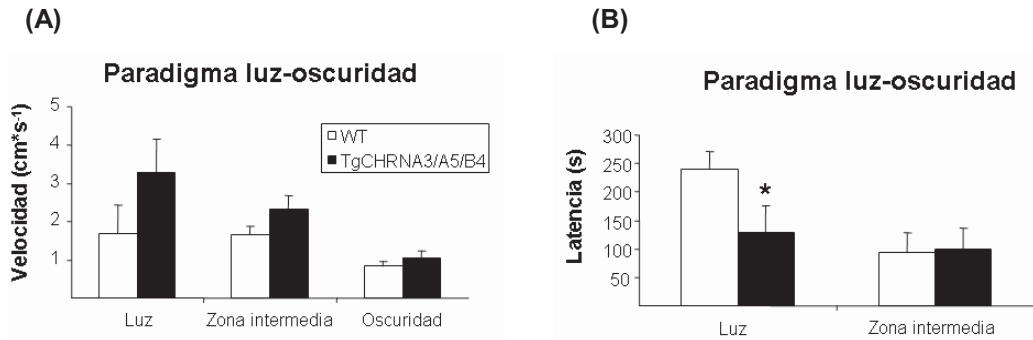


**Figura 15. Test del campo abierto.** (A) Velocidad de desplazamiento en cada zona. (B) Tiempo de permanencia en cada zona medido en porcentaje. (C) Distancia recorrida en cada zona medida en porcentaje. Los animales controles (WT) se muestran con barras blancas y los TgCHRNA3/A5/B4 con barras negras. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*\* $P < 0.01$ .

### Paradigma luz-oscuridad

Al igual que se observó en el campo abierto, el análisis del paradigma luz-oscuridad, reveló una tendencia de los animales TgCHRNA3/A5/B4 a incrementar la velocidad en las zona iluminada e intermedia (Figura 16A), a las cuales se adscribe un componente más aversivo. Estos resultados, junto con una reducción significativa de la latencia de entrada en la zona iluminada (Figura 16B) en los animales TgCHRNA3/A5/B4 ( $F(1,18) = 4.49$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía),

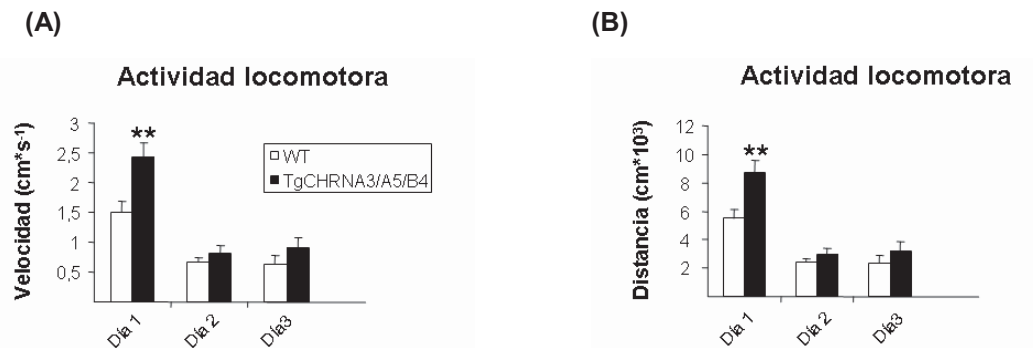
corroboran un fenotipo con tendencia más ansiosa y cierto grado de impulsividad en estos animales.



**Figura 16. Paradigma luz-oscuridad en el TgCHRNA3/A5/B4.** (A) Velocidad adquirida en cada zona. (B) Latencia de entrada en cada zona. Los animales controles (WT) se muestran con barras blancas y los TgCHRNA3/A5/B4 con barras negras. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05.

### 5.2.3. La actividad locomotora del TgCHRNA3/A5/B4 se incrementa en un entorno novedoso

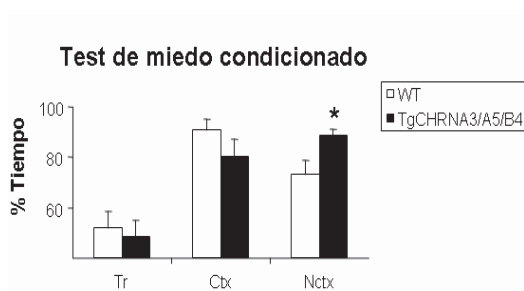
El estudio de la actividad locomotora se evaluó mediante actimetría en cajas de actividad. El análisis de los resultados mostró un incremento de la velocidad (Figura 17A) de los animales TgCHRNA3/A5/B4 ( $F(1,24) = 9.30$   $P < 0.01$  ANOVA de una vía) y de la distancia (Figura 17B) recorrida ( $F(1,24) = 8.96$   $P < 0.01$  ANOVA de una vía) durante la sesión de habituación (1er día). Sin embargo, en los días sucesivos a la sesión de habituación no se observaron diferencias entre genotipos, ni en velocidad (Día 2:  $F(1,26) = 1.04$  n.s.; Día 3:  $F(1,28) = 1.29$  n.s., ANOVA de una vía), ni tampoco en distancia recorrida (Día 2:  $F(1,26) = 1.03$  n.s.; Día 3:  $F(1,28) = 1.24$  n.s., ANOVA de una vía).



**Figura 17. Actividad locomotora en el TgCHRNA3/A5/B4.** (A) Velocidad de desplazamiento y (B) distancia recorrida durante cada día a lo largo de tres días consecutivos. Los animales controles (WT) se representan en barras blancas y los TgCHRNA3/A5/B4 en barras negras. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos  $**P < 0.01$ .

#### 5.2.4. El TgCHRNA3/A5/B4 mostró alteraciones en memorias de miedo condicionado bajo condiciones no contextuales

El test del miedo condicionado nos permitió estudiar la memoria relacionada con el miedo, mediante el análisis de la conducta de congelamiento del ratón. Durante la sesión de aprendizaje no se observaron diferencias en el tiempo de congelamiento entre genotipos (Figura 18). Sin embargo, durante el test el tiempo de congelamiento incrementó en los animales TgCHRNA3/A5/B4 bajo condiciones no contextuales ( $F(1,18) = 5.63$   $P < 0.05$  ANOVA de una vía), mientras que no se detectaron diferencias entre genotipos bajo condiciones contextuales.



**Figura 18. Test de miedo condicionado en el TgCHRNA3/A5/B4.** La gráfica muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento en las diferentes sesiones: aprendizaje: entrenamiento (Tr), sesión de aprendizaje contextual (Ctx) y sesión de aprendizaje no contextual (Nctx). Los animales controles (WT) se muestran con barras blancas y los TgCHRNA3/A5/B4 con barras negras. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos  $*P < 0.05$ .

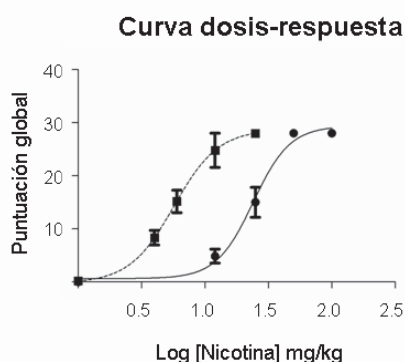
### 5.3. Caracterización farmacológica del ratón TgCHRNA3/A5/B4

#### 5.3.1 La sobreexpresión de CHRNA3/A5/B4 produce hipersensibilidad a los efectos convulsivantes de la nicotina

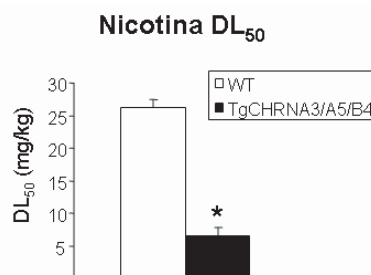
Con el fin de determinar si la sensibilidad a los efectos farmacológicos de la nicotina se inyectó una única dosis de tartato de nicotina por vía subcutánea en animales controles y TgCHRNA3/A5/B4. La observación de la conducta posterior durante 5 minutos evidenció el efecto convulsivante de la nicotina en ambos genotipos. Sin embargo, las dosis a las que se produjeron las convulsiones fueron menores en los animales TgCHRNA3/A5/B4 que en los controles, de forma que la curva dosis-

respuesta de la nicotina (Figura 19A) mostró un desplazamiento hacia la izquierda en el TgCHRNA3/A5/B4, (ANOVA de dos vía (genotipo x tratamiento);  $F(2,62) = 9.59$ ,  $P < 0.001$ ). La dosis letal 50 (DL50) fue de  $26.33 \pm 1.15$  en los animales controles y de  $6.5 \pm 1.23$  en animales TgCHRNA3/A5/B4 (Figura 19B), indicando que los animales TgCHRNA3/A5/B4 fueron 3 veces más sensibles a la nicotina que los animales controles ( $F(1,4) = 12.02$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía).

(A)



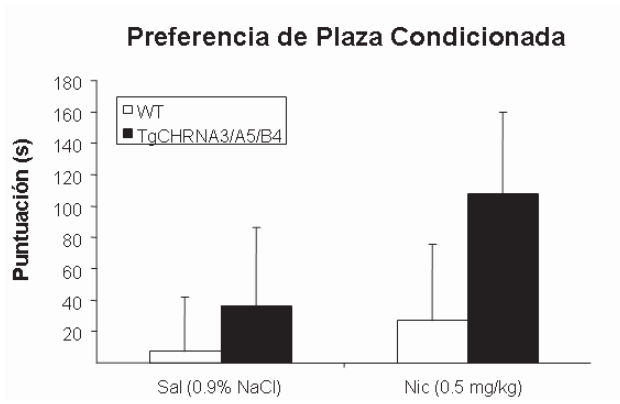
(B)



**Figura 19. Efecto convulsionante de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4.** (A) Curva dosis-respuesta para los efectos convulsivantes de la nicotina, representado como la puntuación global obtenida de las convulsiones producidas por dosis crecientes de nicotina. (B) Gráfica de la DL<sub>50</sub> de nicotina en los animales controles (WT) y TgCHRNA3/A5/B4, representada como mg de nicotina por kg de ratón. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \* $P < 0.05$ .

### 5.3.2. Estudio del efecto adictivo de la nicotina en el TgCHRNA3/A5/B4

Para el estudio de los efectos reforzantes de la nicotina sobre el TgCHRNA3/A5/B4 se utilizó la prueba de la preferencia de plaza condicionada (Figura 20). Los resultados, aunque no fueron significativos mostraron una mayor preferencia de plaza en los TgCHRNA3/A5/B4 después del condicionamiento con nicotina, sugiriendo un mayor efecto reforzante de la nicotina sobre los TgCHRNA3/A5/B4.

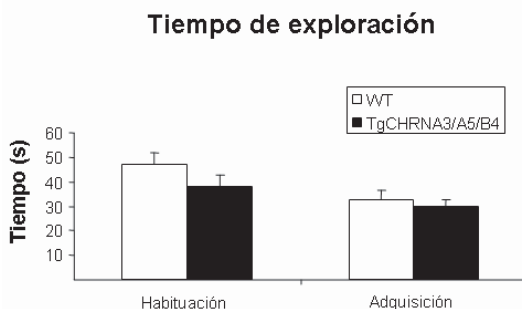


**Figura 20. Preferencia de Plaza Condicionada.** La gráfica muestra el tiempo de permanencia en el compartimiento condicionado. El grupo tratado con salino corresponde al control negativo. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M.

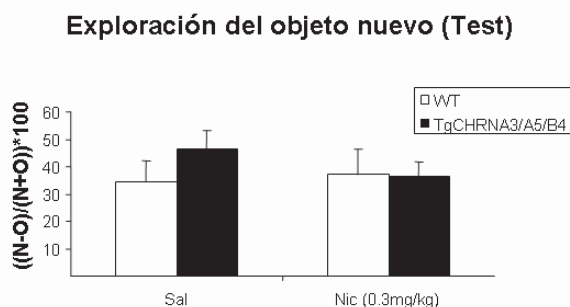
### 5.3.3. Reconocimiento de objetos en el campo abierto tras administración aguda de nicotina

Para estudiar el efecto de la nicotina sobre la consolidación de memorias en el TgCHRNA3/A5/B4, se realizó el test de reconocimiento de objetos. Para ello, los animales fueron habituados a la prueba el día antes del experimento, donde los animales controles y los TgCHRNA3/A5/B4 mostraron un tiempo de exploración parecido (Figura 21A). El día del experimento, y durante la sesión de adquisición tampoco se observaron diferencias en el tiempo de exploración de los objetos entre animales controles y TgCHRNA3/A5/B4 (Figura 21A). Después de la adquisición los animales se inyectaron con salino o nicotina, y al cabo de una hora se realizó el test, donde uno de los objetos fue sustituido por otro nuevo. Los resultados aunque no significativos, muestran en el grupo tratado con salino, un ligero incremento de la exploración del objeto nuevo en los animales TgCHRNA3/A5/B4 frente a los controles (Figura 21B), mientras que el grupo tratado con nicotina no mostró ninguna diferencia entre genotipos en el tiempo de exploración del objeto nuevo (Figura 21B).

(A)



(B)

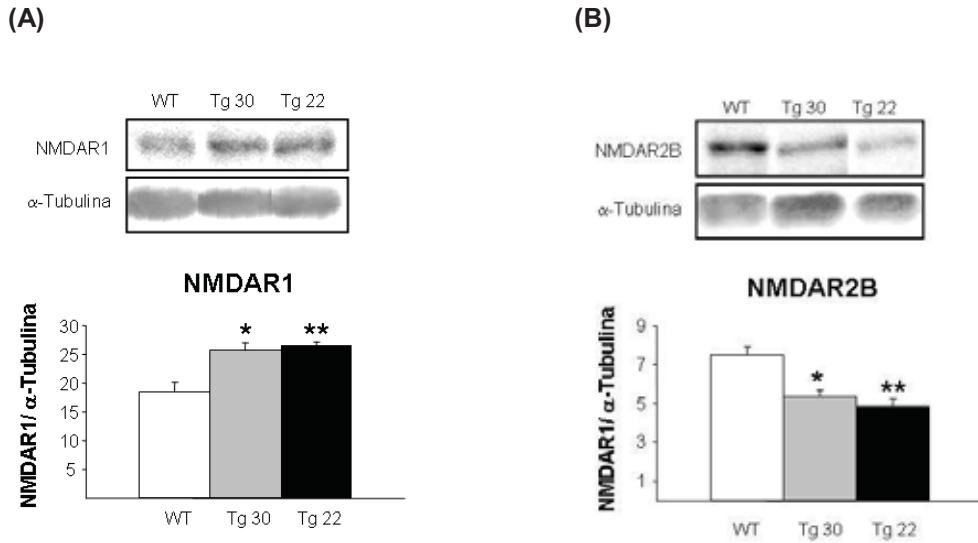


**Figura 21. Reconocimiento de objetos tras administración de nicotina.** (A) Tiempo de exploración de objetos durante la habituación (dos objetos diferentes con la misma preferencia por los animales) y la adquisición (dos objetos idénticos). (B) Porcentaje de tiempo de exploración del objeto nuevo tras administración de salino (0.9% NaCl) o nicotina (0.3 mg/kg) medido como la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el antiguo y dividido por la suma de los dos. Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M.

### **5.4. Alteraciones en la expresión de las subunidades NR1 y NR2B de receptores glutamatérgicos en la corteza cerebral de los animales TgCHRNA3/A5/B4**

Uno de los factores que debíamos descartar a la hora de determinar la especificidad de los efectos farmacológicos de la nicotina y las bases moleculares de el incremento de sensibilidad a la misma en el ratón transgénico era la posible modulación de receptores NMDA. Se ha postulado que alteraciones en los receptores de NMDA (NMDAR) afectan a la susceptibilidad de padecer convulsiones, cuyo foco de iniciación se encuentra principalmente en la corteza cerebral (Narita et al., 2000; Gashi et al., 2007). Además las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ , y  $\alpha 3$  se han visto relacionadas con los efectos convulsivantes de la nicotina (Kedmi et al., 2004). Por todo ello, se estudió la expresión de diferentes subunidades de NMDAR en la corteza cerebral de animales TgCHRNA3/A5/B4 (Figura 22). Los resultados mostraron un incremento en la expresión de la subunidad NR1 en animales TgCHRNA3/A5/B4 cuando se comparó con animales controles (Figura 22A). Sin embargo este incremento fue significativo en transgénicos de la L22 ( $F(1,6) = 17.51$ ,  $P < 0.01$ , ANOVA de una vía) pero solo una tendencia significativa en los de la L30 ( $F(1,4) = 6.68$ ,  $P = 0.61$ , n.s., ANOVA de una vía). Además, también se observó una disminución de la expresión de la subunidad NR2B (Figura 22B) en ambas líneas de transgénicos cuando se compararon con los animales controles ( $F(1,6) = 22.12$ ,  $P < 0.01$  Tg22 y  $F(1,4) = 11.30$ ,  $P < 0.05$  Tg30 ANOVA de una vía). Los estudios de expresión de la subunidad NR2A no mostraron diferencia entre genotipos en ninguna de las dos líneas (Tg22:  $F(1,7) = 0.32$ , n.s. y Tg30:  $F(1,5) = 1.07$ , n.s., ANOVA de una vía).





**Figura 22. Expresión de las subunidades NR1 y NR2B en la corteza cerebral mediante el análisis por western blot. (A)** Niveles de expresión de la subunidad glutamatergica NR1. **(B)** Niveles de expresión de la subunidad glutamatergica NR2B. Las gráficas muestran la ratio entre las subunidades y el control de proteína ( $\alpha$ -Tubulina) de los animales controles (WT) y de las dos líneas de animales TgCHRNA3/A5/B4 (Tg 30 y Tg 22). Los datos están expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

Los pacientes duales constituyen el 30-50% de la población psiquiátrica y más del 80% de la población toxicómana. Nuestra hipótesis propone la existencia de una asociación genética entre algunos genes de susceptibilidad y determinados rasgos patológicos comunes a los trastornos de ansiedad y a los trastornos adictivos, es decir a la patología dual. La presente Tesis Doctoral aborda el estudio del posible papel en la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y abuso de sustancias de dos genes pertenecientes a familias con funciones muy diferentes en el sistema nervioso central, y cuya implicación en estos trastornos se produciría por mecanismos independientes.

## **1. CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE LA PATOLOGÍA DUAL EN EL TGNTRK3**

La primera parte de esta Tesis se centra en el estudio del gen *NTRK3* que codifica para el receptor de NT-3 (TrkC). Proponemos que la disregulación de la expresión de este gen podría modificar el desarrollo y la capacidad de adaptación cerebral en regiones implicadas en el procesamiento de la información emocional, a través de sus efectos sobre proliferación y plasticidad neuronal (Chalazonitis, 1996; Zhou and Rush, 1996). Un primer argumento es que TrkC se expresa junto con el receptor de BDNF (TrkB) en áreas cerebrales (King et al., 1999) implicadas en trastornos psiquiátricos (Orellana Vidal, 1995) y en la dependencia a sustancias de abuso (Rasmussen, 1995; Christie et al., 1997; Han et al., 2006; Koylu et al., 2006) como el LC. De hecho, el LC se ha relacionado con los aspectos físicos de la adicción a opiáceos, es decir, con la dependencia física y el síndrome de abstinencia (Rasmussen et al., 1990; Ivanov and Aston-Jones, 2001), pero también con los trastornos de pánico (Priolo et al., 1991; Gorman et al., 2000; Protopopescu et al., 2006) y con otros trastornos de ansiedad (Bremner et al., 1996; Tanaka et al., 2000) por lo que muy posiblemente sea una región clave en la comorbilidad entre ambos trastornos.

Un segundo argumento es que la sobreexpresión de TrkC produce alteraciones estructurales y en la actividad neuronal del LC (Dierssen et al., 2006). Estas alteraciones parecen repercutir a nivel conductual, ya que se ha observado un fenotipo ansioso y una mayor reacción de pánico en el ratón TgNTRK3 (Dierssen et

al., 2006). En esta Tesis nos hemos centrado en la caracterización de los aspectos conductuales, neuroquímicos y neurofarmacológicos relacionados con la comorbilidad entre el trastorno de pánico y el abuso de sustancias en el modelo TgNTRK3. Hemos demostrado cambios significativos en la respuesta a opiáceos y en el perfil de dependencia física, que sugieren que la sobreexpresión de TrkC modifica el proceso adaptativo a nivel celular y conductual frente al uso crónico de opiáceos, posiblemente por alterar los patrones de expresión de neurotrofinas. Estos cambios se observan asimismo en condiciones basales, dando lugar a modificaciones significativas tanto en la estructura como en la función de diversas regiones cerebrales con consecuencias sobre el fenotipo conductual. Los resultados obtenidos en esta Tesis apoyan que alteraciones en los niveles del sistema NT-3/TrkC podrían tener un papel clave en la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y abuso de sustancias.

### **1.1. La sobreexpresión de TrkC provoca una disfunción noradrenérgica**

Los trabajos previos realizados en el modelo TgNTRK3 han demostrado un incremento de la densidad celular de neuronas noradrenérgicas del LC (Dierssen et al., 2006). La repercusión funcional de este incremento de celularidad de neuronas noradrenérgicas se ha observado mediante los estudios electrofisiológicos presentados en esta Tesis Doctoral, los cuales han mostrado que la actividad basal de las neuronas del LC se encuentra significativamente elevada en los ratones TgNTRK3 comparada con los control no transgénicos. Esta mayor actividad basal de neuronas del LC en TgNTRK3 podría explicar el incremento en la reacción de pánico observado en estos ratones (Dierssen et al., 2006), ya que diversos estudios han sugerido que los ataques de pánico podrían ser la consecuencia de una hiperactividad del LC (David Johnson, 2003).

El mecanismo subyacente a esta hiperactividad del LC puede ser múltiple. De interés para el problema central de esta Tesis, se conoce que la exposición a estrés produce un incremento de la actividad de neuronas del LC (Passerin et al., 2000; Ebner and Singewald, 2007) que se ha relacionado con trastornos de ansiedad (Grillon et al., 2007) y/o con trastornos adictivos (Goeders, 2003), si bien este hecho se ha cuestionado recientemente (van Duinen et al., 2008). De hecho, la activación

del LC parecer ser un componente integral del estrés, el circuito subyacente del cual no ha sido elucidado. Estudios electrofisiológicos muestran que el LC es activado por diversos estresores como son los estímulos nociceptivos la hipotensión, la hipoxia o la estimulación visceral, que incrementan la descarga espontánea de las neuronas del LC. Cuando los animales son expuestos a estrés crónico, se registra una mayor actividad de las neuronas del LC, que se acompaña de cambios plásticos (Nakamura, 1991; Lino-de-Oliveira et al., 2001). Ello sugiere que CRH, principal activador del LC en situaciones de estrés, a nivel del tronco del encéfalo podría ser uno de los neuromoduladores responsables de la sintomatología asociada a la hiperactividad del LC. En este sentido, trabajos de nuestro laboratorio (Amador et al., sometido), sugieren que los ratones TgNTRK3 presentan una mayor respuesta a estresores y desarrollan peores estrategias de afrontamiento.

Sin embargo hay otros neurotransmisores moduladores de la actividad del LC, que podrían jugar un papel clave en el fenotipo observado. Es el caso de los opioides endógenos (Valentino and Van Bockstaele, 2008). Tanto opioides como CRH inervan la zona dendrítica peri-coerulea, aunque el origen de sus aferencias es diferente (Tjounakaris et al., 2003) y la exposición a estrés provoca un incremento de la liberación de ambos en el LC, con consecuencias opuestas sobre su actividad. Así, la influencia inhibitoria de los opioides liberados por acción de un estímulo estresante contrarrestaría los efectos excitatorios del CRH y modularía la respuesta noradrenérgica al estrés (Tjounakaris et al., 2003).

En este contexto, una disregulación del sistema opioide provocaría un estado de activación sostenida del LC, y como consecuencia una hipersensibilidad de éste, que podría participar en trastornos de ansiedad y/o ataques de pánico. En apoyo de esta hipótesis, estudios clínicos han mostrado que individuos normales que manifiestan elevada reactividad fisiológica a la naloxona y a lactato, presentan una elevada puntuación en la escala de pánico (Sinha et al., 2007) y la administración de antagonistas opioides como la naltrexona desencadena ataques de pánico en pacientes con trastorno de pánico (Maremmani et al., 1998). Ello se podría interpretar como una hipofunción tónica o fásica del sistema opioide en pacientes con trastornos de pánico pero también en personas con susceptibilidad a padecer

pánico. Sin embargo, otros estudios no han podido corroborar este resultado, ya que observan que el pretratamiento con naloxona no intensifica o modula la respuesta al lactato en pacientes con pánico (Liebowitz et al., 1984), si bien este resultado podría explicarse en base a la dependencia estructural de la acción del lactato, que no depende únicamente del LC.

Otra posibilidad es que la hiperactividad basal observada se debiera a una alteración de los mecanismos de regulación presináptica en el LC. En este sentido, se ha demostrado en pacientes con trastornos de pánico, que los receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos ( $\alpha 2$ -AR) presentan una sensibilidad anormal frente a clonidina (Nutt, 1989; Yeragani et al., 2003), un agonista  $\alpha 2$ , cuyo uso se ha propuesto para disminuir los signos de la abstinencia (Chen et al., 2007) en base a su efectividad en modelos animales y en algunos ensayos clínicos. Estos estudios concuerdan con los resultados observados tras el tratamiento con clonidina en los animales TgNTRK3, que mostraron una menor sensibilidad al fármaco similar a la observada en pacientes con trastornos de pánico.

Sin embargo, no podemos descartar la participación de otros elementos reguladores presinápticos, como los receptores GABAB,  $\mu$ -opioides o receptores de galanina, que son importantes en la regulación de la actividad noradrenérgica (Chieng and Bekkers, 1999). Así, otro sistema que podría estar modulando la actividad noradrenérgica, aunque de una forma más indirecta sería el sistema dopaminérgico (Grace and Rosenkranz, 2002; Zhou et al., 2004; Segovia et al., 2008). De hecho, en el TgNTRK3 se ha observado un incremento de la densidad de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN) y VTA (Dierssen et al., 2006) que podría modular la actividad del LC a través de su acción en la amígdala y la mPFC en situaciones de estrés o frente a drogas de abuso, interfiriendo en la regulación inhibitoria de la mPFC sobre la amígdala.

### **1.2. La sobreexpresión de TrkC modifica la actividad de neuronas del LC en el síndrome de abstinencia a opiáceos**

A la vista de las alteraciones observadas en el LC y con el fin de estudiar la respuesta del sistema noradrenérgico frente a la administración crónica de

opiáceos, se realizaron experimentos electrofisiológicos en el LC de animales tratados con morfina crónica y tras la inducción del síndrome de abstinencia con naloxona. En nuestros experimentos, los animales control no transgénicos mostraron una hiperactividad de las neuronas del LC después del tratamiento crónico con morfina y la inducción de la abstinencia, que se previno mediante el tratamiento con clonidina en concordancia con trabajos previos (Kogan et al., 1992; Akbarian et al., 2001). Sin embargo, en los ratones TgNTRK3, en los que partíamos de una situación basal hiperactividad, no se observó el característico incremento en la actividad del LC durante el síndrome de abstinencia. Por otra parte, el tratamiento con clonidina consiguió una inhibición más pronunciada de la actividad en este núcleo durante la abstinencia en los ratones TgNTRK3.

La interpretación de este fenotipo no es sencilla, debido precisamente a esa elevación de la actividad basal en el LC en el ratón TgNTRK3 (Gallego et al., sometido) que alcanzan niveles similares a los que se observan en los animales control tras el síndrome de abstinencia. Una primera consideración de carácter metodológico sería que en nuestros experimentos electrofisiológicos, la actividad celular se registró en cortes coronales, por lo que las aferencias hacia el LC habían sido afectadas. Se ha propuesto que las proyecciones excitatorias hacia el LC y otros grupos de células noradrenérgicas contribuyen a la desinhibición noradrenérgica responsables de la conducta de la sintomatología del síndrome de la abstinencia (Aston-Jones et al., 1991; Aghajanian et al., 1994; Chieng and Bekkers, 1999; Williams and Ziedonis, 2004). Sin embargo, en nuestros experimentos el incremento en la actividad del LC observado en los animales control así como la falta de activación en el TgNTRK3 posiblemente no sea consecuencia de un desequilibrio/equilibrio entre los inputs excitatorios e inhibitorios (Van Bockstaele *et al.*, 2000). Tal y como se discute más abajo, nuestras observaciones sugieren que se trata más bien de una afectación de los procesos neuroadaptativos a nivel del LC que tienen lugar como consecuencia de un tratamiento crónico con morfina (Selley et al., 1997).

Una posibilidad sería que hubiéramos alcanzado un “efecto techo” de forma que la máxima capacidad de despolarización no pudiera incrementarse. Sin embargo, si tomamos en conjunto nuestros resultados y otros derivados de estudios previos, es

más plausible que la neuroadaptación subyacente al desarrollo de dependencia estuviera comprometida en el ratón TgNTRK3. En este sentido, se ha propuesto que modificaciones en los niveles de expresión de BDNF/TrkB y NT-3/TrkC podrían ser responsables de la modulación de la expresión de TH y de los cambios en la actividad adenilato ciclasa que subyacen a la dependencia opiácea. Dado que en nuestro sistema existe una disregulación de base en el sistema NT-3/TrkC, podría predecirse que en nuestro modelo existirían alteraciones en los procesos neuroadaptativos que subyacen a la dependencia opiácea (ver apartado 1.6.).

### **1.3. El TgNTRK3 presenta modificaciones en la manifestaciones somáticas de la abstinencia a opiáceos y cambios en la sensibilidad a clonidina**

Con el fin de determinar si las diferencias observadas en los estudios electrofisiológicos tenían una repercusión funcional, decidimos cuantificar las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia que permiten determinar la severidad de la dependencia. En una primera serie de experimentos, la abstinencia se desencadenó mediante la administración de dosis crecientes de morfina y posterior inyección de naloxona. Mediante este protocolo no se observaron diferencias cualitativas ni cuantitativas en los signos conductuales o somáticos de la abstinencia a la morfina entre los animales control y los TgNTRK3. Sin embargo, cuando los animales fueron tratados con clonidina, los signos de la abstinencia se redujeron de forma más marcada en el ratón TgNTRK3 que en el control. El hecho de que la intensidad del síndrome de abstinencia sea igual en ambos genotipos podría interpretarse como la manifestación funcional de que la actividad de neuronas del LC durante la abstinencia fue similar en animales TgNTRK3 y animales control. Por otra parte, el hecho de que la inhibición del LC con clonidina durante la abstinencia a la morfina fuera mucho más intensa en los ratones TgNTRK3, podría estar relacionada con un mayor número de  $\alpha 2$ -AR que describimos en estos ratones (Sahun et al., 2007). Un gran número de estudios han sugerido que el incremento de la actividad del LC es necesario y suficiente para producir una mayor respuesta conductual durante el síndrome de abstinencia (Grant et al., 1988; Lane-Ladd et al., 1997; Maldonado, 1997). Nuestros resultados sin embargo podrían parecer contradictorios a esta afirmación, ya que la actividad

de neuronas del LC no se incrementa durante la abstinencia a la morfina en el TgNTRK3, pero las manifestaciones somáticas del mismo son similares en ambos genotipos. En este sentido, algunos estudios muestran que lesiones en el LC no evitan del todo los signos de la abstinencia (Christie et al., 1997; Aston-Jones et al., 1999; Caille et al., 1999). Sin embargo, nuestros resultados, no descartan la relación funcional directa entre el síndrome de la abstinencia a opiáceos y el LC. Por el contrario, sugieren que otras estructuras cerebrales reguladas por el sistema opioide también podrían participar en el síndrome de abstinencia a la morfina.

#### **1.4. El desarrollo de dependencia mediante dosis constantes de morfina altera las manifestaciones somáticas y conductuales asociadas a la abstinencia en el ratón TgNTRK3**

Pese a que el ratón TgNTRK3 no mostró diferencias en la conducta asociada a la abstinencia de morfina cuando la dependencia se indujo mediante dosis crecientes de morfina, en una segunda serie de experimentos donde el animal fue tratado con dosis más bajas y constantes de morfina, la cuantificación de las manifestaciones somáticas de la abstinencia en el TgNTRK3 mostraron una mayor intensidad del síndrome que las del ratón control.

Si bien en el primer caso las manifestaciones del síndrome de abstinencia correlacionarían bien con los hallazgos electrofisiológicos, en los animales tratados con dosis bajas de morfina no podemos establecer cuales fueron las condiciones de activación del LC tras desencadenar la abstinencia dado que no fue posible realizar experimentos electrofisiológicos en este grupo. Sin embargo, una posible especulación sería que mientras que durante la abstinencia en animales tratados con dosis crecientes de morfina, la activación del LC alcanzaría un “efecto techo”, tal y como discutimos en el apartado anterior, cuando la dependencia se produjo mediante dosis más bajas y constantes de morfina, la activación del LC alcanzaría niveles menores, que permitirían detectar las diferencias entre el ratón TgNTRK3 y el control. Si así fuera, ello de nuevo apoyaría la relación de la activación del LC con el síndrome de abstinencia y explicaría la mayor intensidad de la abstinencia a morfina en los ratones con sobreexpresión de TrkC, cuando la dependencia se produce mediante dosis bajas y constantes.



### **1.5. La sobreexpresión de TrkC podría modular comportamientos asociados a la recaída de la droga tras períodos prolongados de abstinencia**

El abuso de sustancias adictivas se caracteriza por producir cambios adaptativos a largo plazo en el cerebro que no sólo contribuyen a la consolidación del proceso adictivo o de las memorias de miedo, sino que también parecen participar en la mayor vulnerabilidad a la recaída tras un periodo prolongado de abstinencia (Ungless et al., 2001). El síndrome de abstinencia en humanos adictos se ha relacionado con un estado de ansiedad, clave en el mantenimiento de la adicción (Schultheis et al., 1998). Así lo apoyan estudios conductuales en animales abstinentes sometidos a pruebas de ansiedad, como el laberinto en cruz elevado (Bhattacharya et al., 1995; Schultheis et al., 1998; Zhang and Schultheis, 2008) o el paradigma de luz-oscuridad (Berrendero et al., 2003) justo después de la administración de naloxona. Sin embargo, nuestros estudios conductuales utilizando el laberinto circular elevado no detectaron un incremento de la conducta ansiosa ni en animales control ni en los TgNTRK3 tras provocar la abstinencia a morfina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los que no se observó un comportamiento ansioso tras 12 h (Schultheis et al., 1998) o 30 h (Grasing et al., 1996) del cese del tratamiento con morfina. Por tanto este resultado negativo, podría reflejar el hecho de que el incremento de la ansiedad fuera dependiente del tiempo transcurrido tras la abstinencia, ya que nuestros animales fueron sometidos a la prueba después de 30 min de la inyección con naloxona, que se correspondería más a una abstinencia a largo plazo.

Además, en el caso del ratón TgNTRK3 no solo no se observa una conducta ansiosa sino que presenta un comportamiento impulsivo, como se desprende de la latencia de entrada significativamente menor en la zona desprotegida y el mayor tiempo de permanencia en esta zona, con una menor distancia recorrida. Este fenotipo muestra cómo los ratones transgénicos no son capaces de inhibir la conducta de entrada en un espacio que claramente les resulta aversivo. Dado que la conducta impulsiva se ha propuesto como indicador de la recaída a una droga (Poling et al., 2007; Diergaarde et al., 2008), nuestros resultados sugieren que la disregulación de los sistemas de neurotrofinas y sus receptores podrían contribuir a

la mayor impulsividad y por tanto a una mayor tendencia a la recaída, similar a la que se ha observado en pacientes con trastorno de pánico (Doyle and Pollack, 2004) a través de la disregulación del sistema noradrenérgico. Una posible explicación sería que las alteraciones en el LC provocadas por la sobreexpresión de TrkC, y que en cierta medida son compartidas por pacientes con trastorno de pánico modificarían las consecuencias funcionales de la dependencia relacionadas con la recaída.

La importancia de la actividad noradrenérgica en la modulación de la conducta tras la abstinencia a cocaína o morfina en ratas (Harris and Aston-Jones, 1993), es más evidente durante la abstinencia aguda que tras largos períodos de abstinencia (McDougle et al., 1994). Sin embargo, la NA se ha propuesto como el principal neurotransmisor involucrado en la recaída inducida por estrés (Stewart, 2003). En este sentido, diversos estudios han demostrado que la exposición a pruebas conductuales como el laberinto en cruz elevado da lugar a un incremento de corticosterona en plasma (Saitoh et al., 2005). Experimentos realizados en nuestro laboratorio han mostrado un incremento en la respuesta hormonal a estrés en los animales TgNTRK3 tanto en condiciones basales como tras el tratamiento agudo con morfina (Amador et al en preparación).

En conjunto nuestros datos sugieren que esta disregulación del sistema noradrenérgico podría actuar como factor predisponente a la recaída tras un periodo largo de abstinencia a través de su implicación en el eje hipotalámico pituitario (HPA).

### **1.6. Regulación de la expresión de neurotrofinas y sus receptores en el ratón TgNTRK3**

Se ha postulado que el sistema NT-3/TrkC modula los efectos biológicos de los opiáceos a través de su función sobre neuronas noradrenérgicas, si bien existe controversia en lo que se refiere a la relevancia de este sistema respecto a BDNF/TrkB. Hay estudios que sustentan que NT-3 evita la disminución *in vitro* de neuronas del LC que tiene lugar después de una exposición crónica a morfina (Sklair-Tavron and Nestler, 1995). Por otra parte, ratones con delección del gen *NT-*

3 en el SNC muestran una atenuación de los signos de la abstinencia que pueden ser reestablecidos mediante la inserción de un transgén que sobreexpresa NT-3 en células noradrenérgicas (Akbarian et al., 2001). En nuestros experimentos de hibridación *in situ* se confirmó el incremento no solamente de TrkC sino también de NT-3 en los ratones TgNTRk3 en condiciones basales, que habíamos descrito en estudios previos (Dierssen et al., 2006). Este incremento de los niveles de TrkC se acompaña en nuestro modelo de una regulación a la baja de los niveles de mRNA de TrkB, respecto a los de animales control. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre genotipos en los niveles de BDNF. Tanto BDNF como NT-4 incrementan el número de células noradrenérgicas en cultivos celulares del LC (Holm et al., 2003). Además el número de neuronas noradrenérgicas se encuentra reducido en animales mutantes sin TrkB (Holm et al., 2003), mientras que el heterocigoto BDNF+/- presenta un contenido normal de monoaminas (5HT, NA, y DA) (Chourbaji et al., 2004) lo que sugiere que la acción de BDNF sobre neuronas noradrenérgicas depende de la activación de receptores TrkB. Tomando en consideración estos datos, el incremento de neuronas noradrenérgicas observado en el LC del TgNTRK3 (Dierssen et al., 2006) podría ser consecuencia de las alteraciones, no sólo del sistema NT-3/TrkC sino también del BDNF/TrkB de forma que el balance entre ambos sistemas es probablemente determinante del número final de neuronas noradrenérgicas. De interés para nuestro trabajo, las neurotrofinas son capaces de inducir un fenotipo noradrenérgico en neuronas del LC que en el adulto no expresan el enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, la TH (Bezin et al., 2000). Así, la sobreexpresión de TrkC por mecanismos directos, o indirectamente a través de la regulación del sistema BDNF/TrkB, podría ser responsable de alteraciones patológicas del LC, subyacentes al trastorno de pánico y/o a los trastornos adictivos.

El tratamiento crónico con opiáceos y la abstinencia a éstos regulan de forma diferente la expresión de mRNA de neurotrofinas y sus receptores (Seroogy et al., 1994; Numan et al., 1998; Numan and Seroogy, 1999; Hung et al., 2008). Concretamente, tanto el sistema BDNF/TrkB como el NT-3/TrkC han sido propuestos como reguladores de las adaptaciones neuroquímicas producidas durante la exposición a opiáceos (Numan et al., 1998; Akbarian et al., 2001; Akbarian et al., 2002). Se ha demostrado que la exposición crónica a opiáceos

produce un modesto incremento de BDNF y NT-3 en el LC pero no se han observado cambios en TrkC ni en TrkB a nivel de mRNA. Sin embargo, durante la abstinencia se produce un rápido incremento de los niveles de BDNF y una disminución de NT-3, acompañado de un incremento de TrkB y TrkC a las 2 y 6 horas de abstinencia en la rata (Numan et al., 1998). En nuestros experimentos el tratamiento crónico con morfina produce pequeños cambios en el mRNA de BDNF y NT-3 y una disminución de los niveles de TrkB, sin modificaciones en TrkC, en animales control mientras que durante la abstinencia se produce un incremento de BDNF sin cambios en NT-3. Sin embargo, y en discrepancia con las observaciones de estudios previos, los niveles de TrkC en animales control no fueron modificados durante la abstinencia mientras que se observó una disminución pronunciada de los niveles de TrkB.

En conjunto, la sobreexpresión de TrkC provocó una regulación diferencial de NT-3, BDNF y sus receptores TrkC y TrkB después de la administración crónica de opiáceos y durante la abstinencia a éstos. Estos datos sugieren que diferentes combinaciones de factores neurotróficos y sus receptores en circuitos neuronales interconectados con células noradrenérgicas del LC podrían ser responsables de adaptaciones diferenciales en el sistema noradrenérgico provocadas tras el consumo de opiáceos.

### **1.7. La sobreexpresión de TrkC produce cambios celulares adaptativos frente a la exposición a opiáceos**

Está descrito que, la administración crónica de morfina produce un incremento de la expresión de TH y de su actividad catalítica en el LC (Guitart et al., 1990; Lane-Ladd et al., 1997). Junto con este incremento se esperaría un aumento de la capacidad de neuronas noradrenérgicas de sintetizar NA, que podría contribuir a un incremento en la liberación de este neurotransmisor y a los cambios conductuales descritos durante el síndrome de abstinencia a opiáceos (Maldonado et al., 1992; Grasing et al., 1996). En el ratón TgNTRK3, previamente se había descrito un incremento basal de TH, posiblemente consecuencia del incremento en celularidad en el LC (Dierssen et al., 2006) y que podría contribuir al incremento observado en la actividad basal de este núcleo. Sin embargo, en nuestro modelo los niveles de

expresión de TH tras el tratamiento crónico con morfina mediante dosis crecientes de ésta y durante la abstinencia, no fueron diferentes a los observados en los animales control. Estos resultados concuerdan con los estudios electrofisiológicos y conductuales realizados en esta Tesis Doctoral, donde la actividad de las neuronas del LC durante la abstinencia a la morfina y los signos de ésta fueron similares en ambos genotipos.

## **2. CONCLUSIÓN DEL TGNTRK3**

En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TrkC produce cambios estructurales y funcionales a nivel del LC que podrían explicar el incremento de la conducta ansiosa y de la reacción de pánico observada en el TgNTRK3. Además la sobreexpresión de TrkC modifica posiblemente los procesos neuroadaptativos que subyacen a la dependencia opiácea, de forma que sería un elemento importante en la adaptación del LC frente a estímulos externos (Akbarian et al., 2001; Akbarian et al., 2002). Los cambios adaptativos que se producen en las neuronas noradrenérgicas frente a la administración crónica de opiáceos podrían ser considerados como un tipo de plasticidad neuronal (Schulteis et al., 1998) y dependen de mecanismos moleculares similares a los observados durante la memoria y el aprendizaje en centros como el hipocampo. En este sentido, en el ratón TgNTRK3 se observan alteraciones en LTP, como también en potenciales postsinápticos evocados (fEPSP) en la sinápsis CA3-CA1 durante la adquisición de un aprendizaje asociativo (Sahun et al., 2007). Más aún, la sobreexpresión de TrkC reduce la eficiencia de un aprendizaje condicionado, al igual que se ha observado en pacientes con trastornos de pánico (Grillon et al., 2007).

En conclusión nuestros resultados apoyan la hipótesis de que TrkC es un buen candidato para la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y abuso de sustancias y podría constituir el mecanismo subyacente de algunos de los fenotipos conductuales y estructurales propios de la patología dual. Proponemos que el LC tiene un papel como estructura interfaz en esta patología.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE LA PATOLOGÍA DUAL EN EL TGCHRNA3/A5/B4

La segunda parte de esta Tesis se centra en el estudio del posible papel como elemento causal o de susceptibilidad genética en la patología dual, de un cluster genómico localizado en el cromosoma 15q24 formado por los genes *CHRNA3*, *CHRNA5*, y *CHRNB4* que codifican las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs. Estos genes comparten elementos reguladores de su expresión (McDonough and Deneris, 1997; Francis and Deneris, 2002; Xu et al., 2006) y se co-expresan en regiones cerebrales comunes donde tienen la capacidad de formar canales funcionales (Ramirez-Latorre et al., 1996). De forma individual cada una de estas subunidades se ha implicado en la expresión conductual y fisiológica de la ansiedad en ratones (Salas et al., 2003a), en la actividad locomotora y en el efecto convulsivante de la nicotina (Salas et al., 2003b; Salas et al., 2003a; Kedmi et al., 2004; Salas et al., 2004). Sin embargo, todavía no se ha demostrado el papel fisiológico que desempeña el cluster genómico *CHRNA3/A5/B4*, ni su implicación en la patogenia de los trastornos psiquiátricos. Solamente un estudio reciente (Thorgeirsson et al., 2008) sugiere la relación de una variante genética en este cluster con el grado de dependencia a la nicotina. En esta Tesis Doctoral proponemos que el cluster genómico *CHRNA3/A5/B4* es un buen candidato para la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y trastornos de abuso de sustancias. Se trata de un cluster con un elevado grado de conservación filogenético, lo que nos ha permitido sobreexpresar el cluster humano en nuestro modelo murino. Por ello, y dado que la variante descrita por (Thorgeirsson et al., 2008) da lugar a un incremento de la expresión, exploramos la posible implicación de este cluster en la conducta ansiosa, la actividad locomotora y la respuesta a la nicotina en un ratón transgénico de sobreexpresión. En nuestro trabajo hemos abordado la caracterización fenotípica en profundidad del modelo TgCHRNA3/A5/B4, desde el punto de vista conductual, farmacológico y molecular. En todos y cada uno de estos parámetros hemos encontrado respuestas diferenciales entre genotipos.

### 3.1. Validación del modelo TgCHRNA3/A5/B4

La validación de un modelo como el que presentamos no es tarea fácil, ya que el primer nivel de validación ha de constatar la disregulación al alza de la expresión no solamente de uno, sino de tres genes. Ello no es obvio, dado que para sobreexpresar una estructura genómica compleja que agrupa tres genes funcionando coordinadamente, era necesario utilizar mayores longitudes de DNA en las construcciones transgénicas, para poder garantizar la introducción conjunta de todas las secuencias genéticas codificantes y potencialmente reguladoras, y de esta forma, asegurar una correcta expresión del transgén en tiempo, lugar y nivel. Por tanto la estrategia utilizada fue la introducción del DNA exógeno en un BAC donde el transgén se introdujo de forma estable. En nuestro modelo, por tanto, en principio las regiones promotoras propias de cada gen (homólogas) están presentes en el BAC, pero no sabemos si otras regiones reguladoras, que podrían estar situadas en regiones más alejadas, están incluidas en la construcción. Era por tanto necesario determinar, no solamente la sobreexpresión, sino también si el patrón de expresión de cada subunidad era solapable al fisiológico. Ello es fundamental a la hora de entender si la repercusión de la sobreexpresión tiene un sentido fisiopatológico, ya que un patrón de expresión en lugares o momentos no fisiológicos, tendrá consecuencias aberrantes, sin significado real. En nuestros experimentos, el patrón espacial de expresión de los genes *CHRNA3*, *CHRNA5*, y *CHRNA4* fue similar en los animales control y en los TgCHRNA3/A5/B4, descartando la existencia de expresión ectópica, por lo que podemos asumir que el fenotipo observado se debería a la sobreexpresión de las subunidades y no a una localización aberrante de éstas.

Un segundo elemento a tener en consideración es el hecho de que el BAC contiene los genes humanos. Si bien la conservación filogenética del cluster es muy elevada, no podemos descartar que algunas de las funciones de éste pudieran ser diferentes en un contexto genético y celular murino que el contexto humano.

Por otra parte, y a diferencia de otras proteínas, en este caso se sobreexpresamos tres subunidades que han de formar canales iónicos funcionales. Era pues, crucial determinar si tales canales se formaban en nuestro modelo. Para ello, además de

los experimentos de expresión con resolución anatómica (inmunohistoquímica) que permitieron determinar si la expresión de las tres subunidades era solapante, era necesario analizar si la fijación del ligando estaba aumentada. Los experimentos de fijación de receptores que realizamos, junto con el análisis por western blot de las diferentes subunidades demostraron un incremento en el número de sitios de fijación para nicotina, principalmente dependiente, según se extrae del posterior análisis mediante western blot, de un incremento de la subunidad  $\alpha 3$  en el caso de la corteza cerebral y de la subunidad  $\beta 4$  en el caso del hipocampo. Esta regulación diferencial de la expresión de las diferentes subunidades podía implicar diferencias en la funcionalidad de los canales iónicos formados, ya que la composición de los heteropentámeros en los receptores nicotínicos conllevan cambios importantes en sus propiedades biológicas. En este sentido, los estudios farmacológicos mostraron una mayor sensibilidad a nicotina, por lo que podemos inferir que la sobreexpresión del cluster genera canales funcionales con una repercusión en la potencia farmacológica del agonista. Por último, hay que tener en consideración que en este trabajo estamos analizando un efecto de dosis génica que puede repercutir en una disregulación por exceso o por defecto de otros genes y de diferentes vías de señalización. Este hecho hace difícil establecer una relación directa entre el genotipo y el fenotipo, ya que éste no es sólo el resultado directo de la modificación de la expresión de estas subunidades en nuestro modelo, sino de posibles modificaciones que pueden aparecer subsecuentemente a nivel del transcriptoma y del proteoma, y que de hecho observamos en el contexto de este trabajo.

Otra consideración previa de carácter más general en la interpretación de resultados, es que el fenotipo observado puede estar modificado no solamente por el cambio de expresión de estas subunidades, sino por el propio contexto genético en el que éste se produce. En este trabajo no hemos utilizado ratones isogénicos, sino ratones congénicos no completos, una estrategia que logra, a través de retrocruzamientos sucesivos sobre una cepa estándar, homogeneizar el fondo genético del modelo transgénico. Esta estrategia de apareamiento probablemente diluye en cierta medida la influencia del genotipo, pero incrementa la variabilidad interindividual. Este factor es obviamente una desventaja, porque requiere de grupos muy grandes de animales para obtener significación estadística y condiciones experimentales muy homogéneas para reducir esa variabilidad y



extraer conclusiones funcionales. Sin embargo, presenta una ventaja muy importante, y es que los fenotipos, cuando son observables, son probablemente más relevantes respecto a la patología humana, ya que ésta jamás presenta las características homogéneas de isogenicidad.

### **3.2. Validación conductual del TgCHRNA3/A5/B4 como modelo de ansiedad**

En nuestro modelo, la caracterización del perfil neurológico y sensoriomotor no mostró alteraciones significativas dependientes de genotipo. Ello es importante a la hora de evaluar las modificaciones observadas en las pruebas conductuales, ya que permite descartar que el fenotipo observado sea secundario a deficiencias sensoriales, motoras o autonómicas.

En nuestro modelo era necesario incluir en un primer nivel de análisis el perfil de respuesta ansiosa, puesto que por una parte se trata de establecer la validación del modelo para trastornos de ansiedad y por otra, se sabe que los niveles de acetilcolina, el principal ligando endógeno de los nAChRs, se incrementan en respuesta a ambientes novedosos, a estímulos incondicionados, o a una situación estresante (Giovannini et al., 1998) y por tanto eran esperables cambios en este dominio funcional. En el contexto del problema central de esta Tesis, estudios genéticos y de neuroimagen apoyan la existencia de una clara correlación entre el consumo de tabaco y los trastornos neuropsiquiátricos, en concreto trastornos de ansiedad, a través de los nAChRs (revisado en Williams et al., 2004).

En el ratón TgCHRNA3/A5/B4 observamos un incremento de la conducta ansiosa y de la actividad locomotora frente a situaciones novedosas y/o aversivas. Así, los resultados de pruebas como el campo abierto, el o-maze, o el laberinto en cruz elevado, en que se pueden evaluar los cambios conductuales frente a situaciones novedosas en un entorno con componentes ansiogénicos, demostraban un cierto incremento de las conductas relacionadas con la ansiedad en el ratón transgénico. En la interpretación de este fenotipo, hemos de considerar el incremento de los sitios de fijación de nicotina que detectamos en la corteza cerebral y el hipocampo del ratón TgCHRNA3/A5/B4, regiones relacionadas con actividad locomotora,

ansiedad y miedo condicionado (Day et al., 1991). Este incremento junto con el aumento de los niveles de acetilcolina en condiciones estresantes o ansiogénicas descrito previamente (Giovannini et al., 1998), sugieren que la sobreexpresión del cluster podría potenciar las conductas relacionadas con ansiedad.

Por otra parte, en el paradigma luz-oscuridad, que también se utiliza para determinar el fenotipo ansioso, el ratón transgénico mostró un patrón conductual que en un análisis inicial se podría interpretar como una reducción en la ansiedad, ya que la latencia de entrada en la zona iluminada fue significativamente menor que en el ratón control. Sin embargo, una evaluación cuidadosa de este fenotipo, sugiere que se trata de una conducta impulsiva, ya que la velocidad en la zona aversiva fue significativamente mayor que la del animal control, un comportamiento característico de un animal ansioso. Así, la interpretación debe considerar la impulsividad como elemento subyacente a la reducción de la latencia de entrada en la zona aversiva. Esta interpretación vendría a su vez apoyada por el perfil de respuesta que hemos obtenido en otras pruebas (ver más arriba). De interés para la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y abuso de sustancias, la impulsividad es una conducta muy característica del comportamiento compulsivo que se ha relacionado con trastornos adictivos (Olmstead, 2006) sobre todo en individuos fumadores (Diergaarde et al., 2008) en los que se ha descrito un incremento de la impulsividad y una conducta ansiosa (Rondina Rde et al., 2007). Esto, unido a que una variante genética de este cluster se ha relacionado con un incremento de la dependencia a la nicotina (Berrettini et al., 2008; Thorgeirsson et al., 2008), y a nuestros resultados (ver más abajo) en el experimento de preferencia de plaza, sugiere que la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs podría participar en la comorbilidad entre los trastornos de ansiedad y los trastornos adictivos.

En nuestro modelo, la falta de control de una conducta impulsiva podría depender, al menos en parte, de alteraciones en la mPFC (Bechara et al., 2000). Estudios en ratas con lesiones en la mPFC y NAc o tras la manipulación de la función dopaminérgica en el NAc (Cardinal et al., 2001; Christakou et al., 2004; Pattij et al., 2007), sugieren que este patrón conductual podría deberse a la interacción que existe entre el sistema dopaminérgico mesoestriatal y el sistema colinérgico

estriatal. Estos sistemas juegan un papel importante en los procesos motivacionales a través de la activación i/o desensibilización de nAChRs presinápticos en neuronas dopaminérgicas mesoestriatales (Exley and Cragg, 2008). Dado que, las propiedades farmacológicas de los nAChRs dependen del tipo de las subunidades que los conforman, la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  en el TgCHRNA3/A5/B4 probablemente modifica la composición de nAChRs y por lo tanto su capacidad de activación/desensibilización. Estos cambios podrían influir en el balance entre DA y acetilcolina en el estriado, con consecuencias en la respuesta conductual frente a estímulos recompensantes o aversivos. Estos datos contribuirían a explicar el perfil de impulsividad observado en el TgCHRNA3/A5/B4.

### **3.3. La sobreexpresión de las subunidades $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , y $\beta 4$ de nAChRs incrementa las conductas relacionadas con adicción a la nicotina en el ratón**

La nicotina fue clasificada como una sustancia adictiva en 1988 y se considera más adictógena que la heroína o la cocaína. La nicotina actúa sobre el sistema colinérgico, pero es capaz de modular la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico a través de los nAChRs. Como se ha mencionado anteriormente, estudios recientes han demostrado una variación nucleotídica en el cluster genómico *CHRNA3/A5/B4* en individuos con una mayor dependencia a la nicotina (Berrettini et al., 2008; Thorgeirsson et al., 2008) y se ha sugerido que este cluster constituye un determinante importante de la iniciación temprana en el consumo de alcohol y tabaco (Schlaepfer et al., 2008). Esta variante genética tendría como consecuencia funcional un incremento de los niveles de expresión. En este sentido, otros estudios muestran una asociación entre una variante del gen *CHRNA5* que da lugar a un incremento de mRNA y dependencia a alcohol (Wang et al., 2008). Así pues, la evidencia clínica muestra una relación entre el incremento de expresión de todas o alguna de las subunidades contenidas en el cluster y el abuso de sustancias. Estos estudios concuerdan con los resultados que hemos obtenido en la prueba de la preferencia de plaza, los cuales muestran una mayor preferencia por el contexto asociado a la administración de nicotina en los animales TgCHRNA3/A5/B4, sugiriendo que la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y

$\beta 4$  de nAChRs modifica las propiedades reforzadoras de la nicotina.

La dependencia estructural de este fenotipo podría encontrarse en la mPFC y el NAc, que además de relacionarse con una conducta impulsiva (ver más arriba) están implicadas en el efecto reforzador agudo de la nicotina (Stein et al., 1998) y juegan un papel importante en la conducta asociada con la recaída a la droga, tanto en animales (Shaham et al., 2003) como en humanos (Naqvi et al., 2007).

Si bien no podemos dar evidencia conclusiva esta Tesis, dado que el sistema mesocorticolímbico también se ha implicado en trastornos de ansiedad (Gray, 1983), y más concretamente en los relacionados con estrés (Hebb et al., 2004; Hebb et al., 2005; Koya et al., 2005), proponemos que alteraciones en este circuito son un factor importante en trastornos de ansiedad y de abuso de sustancias. Nuestros estudios permiten especular que la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs podría estar alterando la funcionalidad del sistema mesocorticolímbico a través de un incremento de la actividad de estos receptores tras estrés o exposición a drogas de abuso, predisponiendo la aparición i/o comorbilidad de trastornos de ansiedad y trastornos de abuso de sustancias.

### **3.4. Elementos cognitivos en el perfil comportamental del ratón TgCHRNA3/A5/B4: componentes glutamatérgicos**

Además de la caracterización del perfil conductual general y de las conductas asociadas al abuso de sustancias, como la preferencia de plaza, en nuestro modelo analizamos algunos componentes cognitivos específicos que se han relacionado tanto con trastornos de ansiedad como con abuso de sustancias y cuya dependencia del sistema nicotinérgico ha sido demostrada mediante estudios farmacológicos (ver apartado 3.3.). Uno de los sistemas de neurotransmisión que podría subyacer a todos estos procesos es el sistema glutamatérgico, cuya relación con los efectos cognitivos de la nicotina ha sido previamente sugerido. Así pues, en nuestro modelo decidimos analizar los componentes cognitivos y neuroquímicos que pueden subyacer a la patología dual.

**3.4.1. La sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs disregula la expresión de subunidades de receptores NMDA en la corteza cerebral y modifica la memoria de reconocimientos de objetos**

Numerosos estudios proponen al glutamato como el neurotransmisor encargado de la formación de memoria y el aprendizaje a través de su papel en la plasticidad sináptica (Daoudal and Debanne, 2003; MacDonald et al., 2006; Campanac and Debanne, 2007). El ratón TgCHRNA3/A5/B4 mostró un incremento en los niveles de expresión de las subunidades NR1 y una disminución de las subunidades NR2B de receptores NMDA en la corteza cerebral. Es bien conocido que la activación de receptores NMDA corticales es necesaria para la adquisición de memorias asociativas, como demuestran estudios en animales sometidos a la prueba de reconocimiento de objetos (Barker et al., 2006; Barker and Warburton, 2008), de evitación pasiva (Flood et al., 1992) o de miedo condicionado (Lewis and Gould, 2007; Resstel et al., 2007). En nuestro modelo la prueba de reconocimiento de objetos mostró una tendencia significativa al incremento en la exploración de objetos nuevos en el TgCHRNA3/A5/B4 cuando se comparó con el ratón control, indicando una discriminación más eficiente del objeto nuevo, y el establecimiento de la memoria de reconocimiento. Ello sugiere que la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs podría modular la adquisición de memorias asociativas a través de alteraciones en la subunidades NR1 i/o NR2B, y corrobora la existencia de una relación funcional entre el sistema glutamatérgico y el colinérgico (May-Simera and Levin, 2003; De Souza Silva et al., 2006).

Por otra parte, se sabe que la conducta exploratoria da lugar a un incremento de acetilcolina en la corteza cerebral (Giovannini et al., 1998), que también se observa tras la administración de nicotina y que ésta produce una mejoría de la memoria de trabajo (Obinu et al., 2002). El ratón TgCHRNA3/A5/B4 presenta un incremento de los sitios de fijación de nicotina, que redundaría en una mayor sensibilidad frente a agonistas exógenos o a acetilcolina endógena, lo que también podría contribuir al incremento en la exploración de objetos nuevos observado en el TgCHRNA3/A5/B4 a nivel basal (tratado con salino). Sin embargo, después de la administración de nicotina el ratón TgCHRNA3/A5/B4 mostró una menor exploración del objeto nuevo comparada con los niveles de exploración basales. Esto constituiría un efecto paradójico de la nicotina, cuya administración en el ratón transgénico afectaría

negativamente a la memoria de trabajo mientras que en ratones control la mejora. Nuestros datos concuerdan con estudios realizados en fumadores, donde se observa una afectación de la memoria de trabajo, posiblemente debida a alteraciones en la dlPFC (Park et al., 2000). En conjunto, estos datos sugieren que la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs estaría remedando la situación funcional del cerebro de un fumador incrementando los efectos de la acetilcolina en la mejora de la memoria de trabajo pero afectando esta memoria tras la exposición a nicotina. En este sentido es importante recordar que la composición de los receptores nicotínicos va a determinar su potencia farmacológica y también su capacidad de desensibilización. En nuestro caso, es posible que el incremento de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  modifique las propiedades de los receptores nicotínicos con consecuencias directas en memoria y aprendizaje. En concreto, la presencia de subunidad  $\alpha 5$  puede determinar cambios en la desensibilización de receptores nicotínicos frente a la exposición continuada de agonista. Si el cluster de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  está produciendo un patrón en nuestro ratón similar al de la especie humana, nuestros resultados podrían explicar el fenotipo observado en fumadores adictos de forma aguda y tras la exposición a largo término a nicotina.

#### ***3.4.2. La sobreexpresión de CHRNA3/A5/B4 disminuye la respuesta de miedo condicionado dependiente de contexto e incrementa la respuesta de miedo no-contextual***

En general se considera que las drogas que poseen un bajo valor 'hedónico' pero que establecen/mantienen la auto-administración de forma muy intensa, tales como la nicotina o cafeína, requieren una función de facilitación cognitiva (Chaudhri et al., 2006). El ratón TgCHRNA3/A5/B4 presentó una tendencia a la disminución de la respuesta de miedo asociada a contexto y un incremento significativo del miedo condicionado no contextual. Los nAChRs participan en las memorias de miedo, de forma que los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  en el hipocampo dorsal juegan un papel crucial como mediadores del efecto facilitador de la nicotina en el miedo condicionado contextual (Davis et al., 2007). En concreto, la activación de nAChRs que contienen la subunidad  $\beta 2$  son elementos clave en la adquisición del miedo condicionado contextual y en los efectos del síndrome de abstinencia sobre éste (Davis and Gould, 2007; Portugal et al., 2008). Por otro lado, se ha sugerido que la combinación de subunidades  $\alpha 3\beta 4$  modula las memorias emocionales asociativas

(Zhu et al., 2005). Además, es bien conocido que la administración de nicotina puede favorecer los procesos cognitivos (Swan and Lessov-Schlaggar, 2007) y en el caso de memorias asociativas modula el miedo condicionado contextual sin afectar al no contextual. De hecho, experimentos preliminares no incluidos en esta Tesis, demuestran un efecto diferencial de la nicotina sobre el miedo condicionado en los ratones TgCHRNA3/A5/B4.

Sin embargo, se han de considerar otros factores. Por una parte, las alteraciones de receptores NMDA en la corteza cerebral que no sólo se ha relacionado con memoria de trabajo, sino también con memorias asociadas al miedo (Lissek and Gunturkun, 2003; Burgos-Robles et al., 2007), de forma que el bloqueo mediante sRNAi de subunidades NR2B en la corteza cingulada anterior disminuye la respuesta de miedo condicionado asociado a contexto (Zhao et al., 2005). Por tanto, dadas las alteraciones en la expresión de receptores NMDA presentes en nuestro modelo, una posible explicación al fenotipo observado sería la disminución de las subunidades NR2B en la corteza cerebral observada en el TgCHRNA3/A5/B4. Además, esta respuesta es región-específica, ya que el bloqueo de receptores formados por subunidades NR2B en hipocampo no afecta a la memoria asociada al miedo (Zhao et al., 2005). Estos datos podrían justificar el fenotipo observado en el TgCHRNA3/A5/B4, en el que no se encontraron diferencias en la expresión de ninguna de las subunidades de receptores NMDA en el hipocampo, pero sí en cortex cerebral, donde la disminución de subunidades NR2B podría contribuir al fenotipo, apoyando la hipótesis de que el sistema glutamatérgico media los efectos cognitivos de la nicotina.

Aunque este argumento puede explicar en parte el fenotipo, no justificaría el incremento de la respuesta de miedo independiente de contexto en el TgCHRNA3/A5/B4. El aprendizaje y la memoria asociada a estímulos aversivos cuando se forman independientemente del contexto (Power and McGaugh, 2002), se encuentran regulados por proyecciones colinérgicas que recibe la BLA desde el núcleo basal magnocelular, y dependen específicamente de la formación de LTP en la amígdala, mientras que las asociadas a contexto dependerían del hipocampo. Se sabe que la activación de BLA está modulada por nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 3\beta 4$ , localizados en las interneuronas GABAérgicas de la BLA (Zhu et

al., 2005), sugiriendo que un incremento de estas subunidades inhibiría la BLA disminuyendo así la respuesta de miedo no contextual. En el TgCHRNA3/A5/B4, sin embargo, se observa lo contrario, es decir, se produce un incremento de la respuesta de miedo independiente de contexto, a pesar de que en las tinciones inmunohistoquímicas realizadas en el ratón transgénico hemos observado expresión de las tres subunidades en BLA.

Una posible explicación del incremento de memoria no contextual observado en el TgCHRNA3/A5/B4 podría ser que los nAChRs en exceso en este ratón estén formados por las subunidades  $\alpha 3\beta 4$ , que también contienen la subunidad  $\alpha 5$ . Esta configuración resulta interesante, porque se sabe que la subunidad  $\alpha 5$  es capaz de modificar las propiedades del receptor, incrementando la ratio de desensibilización y disminuyendo la eficacia del ligando por el receptor (Wang et al., 2008). Así, la consecuencia final de la sobreexpresión de las tres subunidades sería la disminución de la eficacia inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas sobre la BLA, incrementando la respuesta de miedo condicionado independiente de contexto.

Por último, y, si bien en el contexto de este trabajo no hemos explorado la memoria a largo plazo, hemos de considerar las diferencias observadas en el TgCHRNA3/A5/B4 de los niveles de expresión de la subunidad NR1 en la corteza cerebral. Diversos estudios han demostrado la importancia de la subunidad NR1 en la retención a largo plazo de memorias asociadas al miedo (Cui et al., 2004), poniendo de manifiesto que una disminución de esta subunidad en la PFC tras un largo período de tiempo después del aprendizaje asociativo disminuye la respuesta al miedo condicionado (tanto contextual como no contextual). Así, el incremento en la corteza cerebral de la subunidad NR1 de receptores NMDA en el ratón TgCHRNA3/A5/B4 podría alterar el almacenaje de memorias asociadas al miedo, convirtiéndolas en permanentes y por lo tanto haciendo de este cluster un sustrato para el desarrollo de trastornos de ansiedad.

### ***3.4.3. La sobreexpresión de CHRNA3/A5/B4 produce hipersensibilidad a los efectos convulsivantes de la nicotina***

Los estudios de fijación realizados mostraron un incremento de los sitios de fijación para nicotina, tanto en corteza cerebral como en hipocampo en los animales



transgénicos. Sin embargo, el análisis de los niveles de expresión de las diferentes subunidades del cluster mostró que ésta era diferencial en función de la región y de la subunidad, aunque sin existir expresión ectópica, como demostraron los estudios inmunohistoquímicos. En nuestros experimentos, el incremento de fijación de nicotina en corteza parece ser dependiente del incremento de subunidades  $\alpha 3$ , mientras que en el hipocampo sería debido al incremento de subunidades  $\beta 4$ . No podemos descartar cierta sobreexpresión de las otras subunidades que no fuera detectable mediante western blot, ni podemos anticipar las posibles combinaciones funcionales que pudieran conformar los receptores responsables del incremento de la fijación del ligando observada en el ratón transgénico. Hay estudios que demuestran la implicación de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , y  $\beta 4$  de nAChRs en el efecto convulsivante de la nicotina (Salas et al., 2003b; Salas et al., 2003a; Kedmi et al., 2004; Salas et al., 2004). Por tanto era necesario determinar si el incremento de los sitios de fijación para nicotina representaban ser canales funcionales. Para ello realizamos estudios farmacológicos en los que los animales fueron tratados con nicotina. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad a los efectos convulsivantes de ésta en el ratón TgCHRNA3/A5/B4, tal como muestra el desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta y la significativa reducción de la  $DL_{50}$ . Estos resultados sugieren que los receptores creados en exceso debido a la sobreexpresión del cluster son funcionales. Sin embargo, hemos de considerar que otros mecanismos podrían actuar de forma indirecta en el efecto observado. En este sentido, además de nAChRs, es bien conocida la participación de receptores NMDA y GABAA en la generación de las convulsiones (Morimoto, 1989; Armijo et al., 2000; Chan et al., 2006). Así pues, las alteraciones observadas en la corteza cerebral a nivel de receptores de NMDA en el ratón TgCHRNA3/A5/B4 junto con estudios que demuestran la importancia de la ratio NMDAR1:NMDAR2A/2B en la susceptibilidad de padecer ataques epilépticos (Gashi et al., 2007), podrían explicar el incremento de los efectos convulsivantes de la nicotina en el ratón TgCHRNA3/A5/B4. Más aún, este incremento podría explicar la relación que se ha establecido en humanos entre el cluster y la epilepsia nocturna.

Por otro lado, se ha sugerido que la ansiedad o los ataques de pánico son los síntomas cardinales de un episodio epiléptico (Biraben et al., 2001). Una de las

explicaciones es la existencia de conexiones recíprocas entre la amígdala y la OFC y la corteza cingulada (Reimer et al., 1975; Gloor et al., 1982), ya que una descarga del foco epiléptico estimula estructuras límbicas como la amígdala que a su vez activa focos epilépticos en regiones como la corteza cingulada, la OFC y el lóbulo temporal epiléptico, además de ser la responsable de la aparición de síntomas de ansiedad (Biraben et al., 2001; Aroniadou-Anderjaska et al., 2007). Estos estudios sugieren que alteraciones en la vía corticolímbica podrían ser las responsables de la comorbilidad entre trastornos de ansiedad y trastornos epilépticos.

#### **4. CONCLUSION DEL TGCHRNA3/A5/B4**

La sobreexpresión del cluster genómico *CHRNA3/A5/B4* incrementa la formación de nAChRs funcionales con efectos secundarios sobre la expresión de receptores de NMDA en la corteza cerebral que podrían estar jugando un papel clave en la ansiedad, en los efectos reforzadores de la nicotina, en la adquisición y consolidación de memorias asociativas, así como también en la activación de focos epilépticos, a través de su interacción con la BLA. Además, la formación de nAChRs compuestos por subunidades de este cluster genómico podrían estar modificando la ratio de desensibilización del receptor y como consecuencia afectar la respuesta frente a estímulos como las drogas de abuso o el estrés, a través de alteraciones en el sistema mesolímbico y mesoestriatal, promoviendo el desarrollo de conductas impulsivas características de trastornos de abuso de sustancias y trastornos de ansiedad. Los datos obtenidos de esta Tesis Doctoral, junto con los estudios de Thorgeirsson et al., (2008) demuestran la implicación del este cluster genómico en la adicción a nicotina y además aportan la evidencia de su comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos, como la ansiedad y la epilepsia.

### **TgNTRK3**

1. La sobreexpresión de TrkC produce un incremento de la actividad de neuronas del LC que podría contribuir al fenotipo ansioso observado en el TgNTRK3. La disregulación de receptores  $\alpha$ 2-AR y/o los cambios en la eficacia de agonistas opiáceos que actúan sobre receptores  $\mu$ -opioides que hemos detectado en este modelo podrían ser responsables, en parte, de este fenotipo a través de una reducción de la inhibición fisiológica de neuronas del LC.

2. La sobreexpresión de TrkC no afecta a la sensibilización locomotora inducida por la morfina ni al desarrollo de la tolerancia a su efecto antinociceptivo, pero produce cambios a nivel conductual durante la abstinencia a esta droga.

3. La sobreexpresión de TrkC, modifica las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del LC, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento crónico con agonistas opiáceos, que en el ratón transgénico no produce el incremento de actividad neuronal característico del síndrome de abstinencia. Ello podría deberse a una alteración del patrón de cambios adaptativos que se producen en el LC después de un tratamiento crónico con morfina, secundaria a los cambios observados en la expresión de factores neurotróficos y sus receptores

### **TgCHRNA3/A5/B4**

4. La sobreexpresión del cluster genético compuesto por las subunidades  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5, y  $\beta$ 4 de receptores nicotínicos produce un fenotipo ansioso e impulsivo, y un incremento del efecto reforzador de la nicotina. Asimismo, se producen cambios en la eficiencia de memorias asociativas.

5. La sobreexpresión de las subunidades  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5, y  $\beta$ 4 de receptores nicotínicos produce hipersensibilidad a los efectos convulsivantes de la nicotina.

6. El TgCHRNA3/A5/B4 presenta modificaciones en los niveles de expresión de las subunidades de receptores glutamatérgicos NMDA de la corteza cerebral que

podrían actuar como mecanismos comunes a los fenotipos observados.

7. Como conclusión general, los resultados obtenidos demuestran que alteraciones en los niveles de expresión de genes tan diferentes como los factores neurotróficos o los receptores nicotínicos, pueden modificar la actividad de regiones cerebrales implicadas en la aparición simultánea de diferentes trastornos psiquiátricos. De nuestros experimentos se desprende que el sistema mesocorticolímbico junto con regiones troncoencefálicas como el LC jugarían un papel clave en la comorbilidad de trastornos como la ansiedad, la adicción o la epilepsia. Un mecanismo de convergencia podría depender de los cambios en receptores glutamatérgicos, que son elementos clave en la plasticidad neuronal. Nuestros resultados apoyan la naturaleza poligénica de la patología dual y sugieren que los cambios de dosis de determinados genes podrían ejercer un papel esencial en la morbilidad de la misma.

- Ader R (1970) The effects of early experience on the adrenocortical response to different magnitudes of stimulation. *Physiol Behav* 5:837-839.
- Adinoff B (2004) Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv Rev Psychiatry* 12:305-320.
- Aghajanian GK (1978) Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 276:186-188.
- Aghajanian GK, Kogan JH, Moghaddam B (1994) Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 636:126-130.
- Airavaara M, Tuomainen H, Piepponen TP, Saarma M, Ahtee L (2007) Effects of repeated morphine on locomotion, place preference and dopamine in heterozygous glial cell line-derived neurotrophic factor knockout mice. *Genes Brain Behav* 6:287-298.
- Akaoka H, Aston-Jones G (1991) Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J Neurosci* 11:3830-3839.
- Akbarian S, Rios M, Liu RJ, Gold SJ, Fong HF, Zeiler S, Coppola V, Tessarollo L, Jones KR, Nestler EJ, Aghajanian GK, Jaenisch R (2002) Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *J Neurosci* 22:4153-4162.
- Akbarian S, Bates B, Liu RJ, Skirboll SL, Pejchal T, Coppola V, Sun LD, Fan G, Kucera J, Wilson MA, Tessarollo L, Kosofsky BE, Taylor JR, Bothwell M, Nestler EJ, Aghajanian GK, Jaenisch R (2001) Neurotrophin-3 modulates noradrenergic neuron function and opiate withdrawal. *Mol Psychiatry* 6:593-604.
- Alkondon M, Albuquerque EX (2001) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 86:3043-3055.
- Amering M, Bankier B, Berger P, Griengl H, Windhaber J, Katschnig H (1999) Panic disorder and cigarette smoking behavior. *Compr Psychiatry* 40:35-38.

- Anderson KG, Ramo DE, Brown SA (2006) Life stress, coping and comorbid youth: an examination of the stress-vulnerability model for substance relapse. *J Psychoactive Drugs* 38:255-262.
- Armijo JA, de las Cuevas I, Adin J (2000) [Ion channels and epilepsy]. *Rev Neurol* 30 Suppl 1:S25-41.
- Aroniadou-Anderjaska V, Qashu F, Braga MF (2007) Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders. *Amino Acids* 32:305-315.
- Aston-Jones G, Harris GC (2004) Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:167-179.
- Aston-Jones G, Delfs JM, Druhan J, Zhu Y (1999) The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Ann N Y Acad Sci* 877:486-498.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhhattar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B, et al. (1991) Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res* 88:47-75.
- Barker GR, Warburton EC (2008) NMDA receptor plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices is crucial for the acquisition of long-term object-in-place associative memory. *J Neurosci* 28:2837-2844.
- Barker GR, Warburton EC, Koder T, Dolman NP, More JC, Aggleton JP, Bashir ZI, Auberson YP, Jane DE, Brown MW (2006) The different effects on recognition memory of perirhinal kainate and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. *J Neurosci* 26:3561-3566.
- Barlow DH (1997) Anxiety disorders, comorbid substance abuse, and benzodiazepine discontinuation: implications for treatment. *NIDA Res Monogr* 172:33-51.
- Baumann MH, Milchanowski AB, Rothman RB (2004) Evidence for alterations in alpha2-adrenergic receptor sensitivity in rats exposed to repeated cocaine administration. *Neuroscience* 125:683-690.

- Bechara A, Tranel D, Damasio H (2000) Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain* 123 ( Pt 11):2189-2202.
- Bernstein MA, Welch SP (1998) mu-Opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse model of chronic morphine tolerance. *Brain Res Mol Brain Res* 55:237-242.
- Berrendero F, Castane A, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2003) Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur J Neurosci* 17:315-324.
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, Waterworth D, Muglia P, Mooser V (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry* 13:368-373.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33-84.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309-369.
- Beyenburg S, Mitchell AJ, Schmidt D, Elger CE, Reuber M (2005) Anxiety in patients with epilepsy: systematic review and suggestions for clinical management. *Epilepsy Behav* 7:161-171.
- Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Bauer J, Watzka M, Blumcke I, Bidlingmaier F, Elger CE (2001) Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 44:141-153.
- Bezin L, Marcel D, Desgeorges S, Pujol JF, Weissmann D (2000) Singular subsets of locus coeruleus neurons may recover tyrosine hydroxylase phenotype transiently expressed during development. *Brain Res Mol Brain Res* 76:275-281.
- Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Sandler M, Glover V (1995) Rat brain monoamine oxidase A and B inhibitory (tribulin) activity during drug withdrawal anxiety. *Neurosci Lett* 199:103-106.

- Biraben A, Taussig D, Thomas P, Even C, Vignal JP, Scarabin JM, Chauvel P (2001) Fear as the main feature of epileptic seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:186-191.
- Bonati MT, Asselta R, Duga S, Ferini-Strambi L, Oldani A, Zucconi M, Malcovati M, Dalpra L, Tenchini ML (2000) Refined mapping of CHRNA3/A5/B4 gene cluster and its implications in ADNFLE. *Neuroreport* 11:2097-2101.
- Bonson KR, Grant SJ, Contoreggi CS, Links JM, Metcalfe J, Weyl HL, Kurian V, Ernst M, London ED (2002) Neural systems and cue-induced cocaine craving. *Neuropsychopharmacology* 26:376-386.
- Booker TK, Butt CM, Wehner JM, Heinemann SF, Collins AC (2007) Decreased anxiety-like behavior in beta3 nicotinic receptor subunit knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav* 87:146-157.
- Boulter J, O'Shea-Greenfield A, Duvoisin RM, Connolly JG, Wada E, Jensen A, Gardner PD, Ballivet M, Deneris ES, McKinnon D, et al. (1990) Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem* 265:4472-4482.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.
- Brady KT, Sinha R (2005) Co-occurring mental and substance use disorders: the neurobiological effects of chronic stress. *Am J Psychiatry* 162:1483-1493.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS (1996) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse* 23:28-38.
- Brodski C, Schnurch H, Dechant G (2000) Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9683-9688.
- Brown TA, Antony MM, Barlow DH (1995) Diagnostic comorbidity in panic disorder: effect on treatment outcome and course of comorbid diagnoses following treatment. *J Consult Clin Psychol* 63:408-418.



- Buisson B, Bertrand D (2002) Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol Sci* 23:130-136.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ (2007) Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53:871-880.
- Burke JD, Jr., Burke KC, Rae DS (1994) Increased rates of drug abuse and dependence after onset of mood or anxiety disorders in adolescence. *Hosp Community Psychiatry* 45:451-455.
- Caille S, Espejo EF, Reneric JP, Cador M, Koob GF, Stinus L (1999) Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus ceruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 290:881-892.
- Campanac E, Debanne D (2007) Plasticity of neuronal excitability: Hebbian rules beyond the synapse. *Arch Ital Biol* 145:277-287.
- Cardinal RN, Pennicott DR, Sugathapala CL, Robbins TW, Everitt BJ (2001) Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science* 292:2499-2501.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.
- Chalazonitis A (1996) Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system. *Mol Neurobiol* 12:39-53.
- Chan MH, Lee CC, Chen HH (2006) Effects of toluene on seizures induced by convulsants acting at distinct ligand-gated ion channels. *Toxicol Lett* 160:179-184.
- Chao MV, Rajagopal R, Lee FS (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110:167-173.
- Congdon E, Lesch KP, Canli T (2008) Analysis of DRD4 and DAT polymorphisms and behavioral inhibition in healthy adults: implications for impulsivity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:27-32.

- Conway KP, Compton W, Stinson FS, Grant BF (2006) Lifetime comorbidity of DSM-IV mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry* 67:247-257.
- Cui Z, Wang H, Tan Y, Zaia KA, Zhang S, Tsien JZ (2004) Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron* 41:781-793.
- Cummings S, Elde R, Ells J, Lindall A (1983) Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 3:1355-1368.
- Charney DS, Drevets WC (2002) Neurobiological basis of anxiety disorders
- Chaudhri N, Caggiula AR, Donny EC, Palmatier MI, Liu X, Sved AF (2006) Complex interactions between nicotine and nonpharmacological stimuli reveal multiple roles for nicotine in reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 184:353-366.
- Chen SQ, Zhai HF, Cui YY, Shi J, Le Foll B, Lu L (2007) Clonidine attenuates morphine withdrawal and subsequent drug sensitization in rhesus monkeys. *Acta Pharmacol Sin* 28:473-483.
- Chieng B, Bekkers JM (1999) GABA(B), opioid and alpha2 receptor inhibition of calcium channels in acutely-dissociated locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol* 127:1533-1538.
- Childress AR, Hole AV, Ehrman RN, Robbins SJ, McLellan AT, O'Brien CP (1993) Cue reactivity and cue reactivity interventions in drug dependence. *NIDA Res Monogr* 137:73-95.
- Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry* 156:11-18.
- Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, Zorner B, Zacher C, Lang UE, Henn FA, Hortnagl H, Gass P (2004) Mice with reduced brain-derived neurotrophic

- factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behavior. *Brain Res Mol Brain Res* 121:28-36.
- Christakou A, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Prefrontal cortical-ventral striatal interactions involved in affective modulation of attentional performance: implications for corticostriatal circuit function. *J Neurosci* 24:773-780.
- Christie KA, Burke JD, Jr., Regier DA, Rae DS, Boyd JH, Locke BZ (1988) Epidemiologic evidence for early onset of mental disorders and higher risk of drug abuse in young adults. *Am J Psychiatry* 145:971-975.
- Christie MJ, Williams JT, Osborne PB, Bellchambers CE (1997) Where is the locus in opioid withdrawal? *Trends Pharmacol Sci* 18:134-140.
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317-324.
- Damaj MI, Glassco W, Dukat M, Martin BR (1999) Pharmacological characterization of nicotine-induced seizures in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1284-1291.
- Daoudal G, Debanne D (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10:456-465.
- David Johnson J (2003) Noradrenergic control of cognition: global attenuation and an interrupt function. *Med Hypotheses* 60:689-692.
- Davis JA, Gould TJ (2007) beta2 subunit-containing nicotinic receptors mediate the enhancing effect of nicotine on trace cued fear conditioning in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 190:343-352.
- Davis JA, Kenney JW, Gould TJ (2007) Hippocampal alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor involvement in the enhancing effect of acute nicotine on contextual fear conditioning. *J Neurosci* 27:10870-10877.
- Day J, Damsma G, Fibiger HC (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 38:723-729.
- De Souza Silva MA, Dolga A, Pieri I, Marchetti L, Eisel UL, Huston JP, Dere E (2006) Cholinergic cells in the nucleus basalis of mice express the N-

- methyl-D-aspartate-receptor subunit NR2C and its replacement by the NR2B subunit enhances frontal and amygdaloid acetylcholine levels. *Genes Brain Behav* 5:552-560.
- Diergaarde L, Pattij T, Poortvliet I, Hogenboom F, de Vries W, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2008) Impulsive choice and impulsive action predict vulnerability to distinct stages of nicotine seeking in rats. *Biol Psychiatry* 63:301-308.
- Dierssen M, Gratacos M, Sahun I, Martin M, Gallego X, Amador-Arjona A, Martinez de Lagran M, Murtra P, Marti E, Pujana MA, Ferrer I, Dalfo E, Martinez-Cue C, Florez J, Torres-Peraza JF, Alberch J, Maldonado R, Fillat C, Estivill X (2006) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkC exhibit increased catecholaminergic neuron density in specific brain areas and increased anxiety-like behavior and panic reaction. *Neurobiol Dis* 24:403-418.
- Dobelis P, Hutton S, Lu Y, Collins AC (2003) GABAergic systems modulate nicotinic receptor-mediated seizures in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 306:1159-1166.
- Doyle A, Pollack MH (2004) Long-term management of panic disorder. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 5:24-28.
- Duga S, Solda G, Asselta R, Bonati MT, Dalpra L, Malcovati M, Tenchini ML (2001) Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms. *J Hum Genet* 46:640-648.
- Dunn AJ, Swiergiel AH, Palamarchouk V (2004) Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress. *Ann N Y Acad Sci* 1018:25-34.
- Ebner K, Singewald N (2007) Stress-induced release of substance P in the locus coeruleus modulates cortical noradrenaline release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376:73-82.
- Ennis M, Aston-Jones G (1988) Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci* 8:3644-3657.

- Everitt BJ, Robbins TW (2000) Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 153:17-30.
- Exley R, Cragg SJ (2008) Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S283-297.
- Featherby T, Lawrence AJ (2004) Chronic cold stress regulates ascending noradrenergic pathways. *Neuroscience* 127:949-960.
- Ferrari PF, van Erp AM, Tornatzky W, Miczek KA (2003) Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *Eur J Neurosci* 17:371-378.
- Flood JF, Morley JE, Lanthorn TH (1992) Effect on memory processing by D-cycloserine, an agonist of the NMDA/glycine receptor. *Eur J Pharmacol* 221:249-254.
- Flugge G (1999) Effects of cortisol on brain alpha2-adrenoceptors: potential role in stress. *Neurosci Biobehav Rev* 23:949-956.
- Francis N, Deneris ES (2002) Retinal neuron activity of ETS domain-binding sites in a nicotinic acetylcholine receptor gene cluster enhancer. *J Biol Chem* 277:6511-6519.
- Franklin K PG (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Freitag CM, Domschke K, Rothe C, Lee YJ, Hohoff C, Gutknecht L, Sand P, Fimmers R, Lesch KP, Deckert J (2006) Interaction of serotonergic and noradrenergic gene variants in panic disorder. *Psychiatr Genet* 16:59-65.
- Frenois F, Stinus L, Di Blasi F, Cador M, Le Moine C (2005) A specific limbic circuit underlies opiate withdrawal memories. *J Neurosci* 25:1366-1374.
- Gashi E, Avallone J, Webster T, Friedman LK (2007) Altered excitability and distribution of NMDA receptor subunit proteins in cortical layers of rat pups following multiple perinatal seizures. *Brain Res* 1145:56-65.

- Gellert VF, Holtzman SG (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* 205:536-546.
- Giovannini MG, Bartolini L, Kopf SR, Pepeu G (1998) Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res* 784:218-227.
- Gloor P, Olivier A, Quesney LF, Andermann F, Horowitz S (1982) The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 12:129-144.
- Goeders NE (2003) The impact of stress on addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* 13:435-441.
- Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD (2000) Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am J Psychiatry* 157:493-505.
- Grace AA, Rosenkranz JA (2002) Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiol Behav* 77:489-493.
- Grant SJ, Huang YH, Redmond DE, Jr. (1988) Behavior of monkeys during opiate withdrawal and locus coeruleus stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 30:13-19.
- Grasing K, Wang A, Schlussman S (1996) Behavioral measures of anxiety during opiate withdrawal. *Behav Brain Res* 80:195-201.
- Gray AM (1996) Effect of alprazolam on opiate withdrawal: a combined behavioural and microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 313:73-77.
- Gray JA (1983) A theory of anxiety: the role of the limbic system. *Encephale* 9:161B-166B.
- Grillon C, Duncko R, Covington MF, Kopperman L, Kling MA (2007) Acute stress potentiates anxiety in humans. *Biol Psychiatry* 62:1183-1186.
- Guitart X, Hayward M, Nisenbaum LK, Beitner-Johnson DB, Haycock JW, Nestler EJ (1990) Identification of MARPP-58, a morphine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 58 kDa, as tyrosine hydroxylase: evidence for regulation of its expression by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J Neurosci* 10:2649-2659.

- Han MH, Bolanos CA, Green TA, Olson VG, Neve RL, Liu RJ, Aghajanian GK, Nestler EJ (2006) Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. *J Neurosci* 26:4624-4629.
- Hapner SJ, Nielsen KM, Chaverra M, Esper RM, Loeb JA, Lefcort F (2006) NT-3 and CNTF exert dose-dependent, pleiotropic effects on cells in the immature dorsal root ganglion: neuregulin-mediated proliferation of progenitor cells and neuronal differentiation. *Dev Biol* 297:182-197.
- Hariri AR, Weinberger DR (2003) Imaging genomics. *Br Med Bull* 65:259-270.
- Harris GC, Aston-Jones G (1993) Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 113:131-136.
- Hatami H, Oryan S, Semnani S, Kazemi B, Bandepour M, Ahmadiani A (2007) Alterations of BDNF and NT-3 genes expression in the nucleus paraventricularis during morphine dependency and withdrawal. *Neuropeptides* 41:321-328.
- Hebb AL, Poulin JF, Roach SP, Zacharko RM, Drolet G (2005) Cholecystokinin and endogenous opioid peptides: interactive influence on pain, cognition, and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1225-1238.
- Hebb AL, Zacharko RM, Gauthier M, Trudel F, Laforest S, Drolet G (2004) Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice. *Eur J Neurosci* 20:2415-2429.
- Heidbreder CA, Bianchi M, Lacroix LP, Faedo S, Perdona E, Remelli R, Cavanni P, Crespi F (2003) Evidence that the metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP may act as an inhibitor of the norepinephrine transporter in vitro and in vivo. *Synapse* 50:269-276.
- Heinrichs SC, Menzaghi F, Schulteis G, Koob GF, Stinus L (1995) Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. *Behav Pharmacol* 6:74-80.

- Holm PC, Rodriguez FJ, Kresse A, Canals JM, Silos-Santiago I, Arenas E (2003) Crucial role of TrkB ligands in the survival and phenotypic differentiation of developing locus coeruleus noradrenergic neurons. *Development* 130:3535-3545.
- Holmes A, Picciotto MR (2006) Galanin: a novel therapeutic target for depression, anxiety disorders and drug addiction? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:225-232.
- Holmwood DC (2002) Comorbidity of mental disorders and substance use: A brief guide for the primary care clinician. Commonwealth of Australia.
- Holland PC, Gallagher M (1999) Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends Cogn Sci* 3:65-73.
- Hoogendijk WJ, Feenstra MG, Botterblom MH, Gilhuis J, Sommer IE, Kamphorst W, Eikelenboom P, Swaab DF (1999) Increased activity of surviving locus ceruleus neurons in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:82-91.
- Huang YY, Cate SP, Battistuzzi C, Oquendo MA, Brent D, Mann JJ (2004) An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology* 29:1498-1505.
- Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chen C, Goodman G, Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A, McLaughlin J, Liu G, Narod S, Krokan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Hveem K, Vatten L, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Martinez C, Bingham S, Rasmuson T, Hainaut P, Riboli E, Ahrens W, Benhamou S, Laggiou P, Trichopoulos D, Holcatova I, Merletti F, Kjaerheim K, Agudo A, Macfarlane G, Talamini R, Simonato L, Lowry R, Conway DI, Znaor A, Healy C, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M, Brennan P (2008) A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452:633-637.



- Hungund BL, Basavarajappa BS, Vadasz C, Kunos G, Rodriguez de Fonseca F, Colombo G, Serra S, Parsons L, Koob GF (2002) Ethanol, endocannabinoids, and the cannabinoidergic signaling system. *Alcohol Clin Exp Res* 26:565-574.
- Hutcheson DM, Everitt BJ, Robbins TW, Dickinson A (2001) The role of withdrawal in heroin addiction: enhances reward or promotes avoidance? *Nat Neurosci* 4:943-947.
- Irvine EE, Bagnalasta M, Marcon C, Motta C, Tessari M, File SE, Chiamulera C (2001) Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 153:315-320.
- Itoh K, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Iyo M (2004) Association between brain-derived neurotrophic factor 196 G/A polymorphism and personality traits in healthy subjects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 124B:61-63.
- Ivanov A, Aston-Jones G (2001) Local opiate withdrawal in locus coeruleus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 85:2388-2397.
- Jedema HP, Finlay JM, Sved AF, Grace AA (2001) Chronic cold exposure potentiates CRH-evoked increases in electrophysiologic activity of locus coeruleus neurons. *Biol Psychiatry* 49:351-359.
- Johnson JG, Cohen P, Pine DS, Klein DF, Kasen S, Brook JS (2000) Association between cigarette smoking and anxiety disorders during adolescence and early adulthood. *Jama* 284:2348-2351.
- Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Tanaka M (2007) Long-term administration of citalopram reduces basal and stress-induced extracellular noradrenaline levels in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 194:73-81.
- Kedmi M, Beaudet AL, Orr-Urtreger A (2004) Mice lacking neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4-subunit and mice lacking both alpha5- and beta4-subunits are highly resistant to nicotine-induced seizures. *Physiol Genomics* 17:221-229.
- Kelley AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44:161-179.

- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66:285-306.
- King VR, Michael GJ, Joshi RK, Priestley JV (1999) trkA, trkB, and trkC messenger RNA expression by bulbospinal cells of the rat. *Neuroscience* 92:935-944.
- Kogan JH, Nestler EJ, Aghajanian GK (1992) Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in locus coeruleus neurons in brain slices from opiate-dependent rats. *Eur J Pharmacol* 211:47-53.
- Koob GF (1996) Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16:893-896.
- Koob GF (1999) Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann N Y Acad Sci* 897:27-45.
- Koob GF, Stinus L, Le Moal M, Bloom FE (1989) Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 13:135-140.
- Koya E, Spijker S, Homberg JR, Voorn P, Schoffelmeer AN, De Vries TJ, Smit AB (2005) Molecular reactivity of mesocorticolimbic brain areas of high and low grooming rats after elevated plus maze exposure. *Brain Res Mol Brain Res* 137:184-192.
- Koylu EO, Balkan B, Kuhar MJ, Pogun S (2006) Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response. *Peptides* 27:1956-1969.
- Kreek MJ, Ragunath J, Plevy S, Hamer D, Schneider B, Hartman N (1984) ACTH, cortisol and beta-endorphin response to metyrapone testing during chronic methadone maintenance treatment in humans. *Neuropeptides* 5:277-278.
- Kudryavtseva NN, Gerrits MA, Avgustinovich DF, Tenditnik MV, Van Ree JM (2004) Modulation of anxiety-related behaviors by mu- and kappa-opioid receptor agonists depends on the social status of mice. *Peptides* 25:1355-1363.
- Kunugi H, Vallada HP, Sham PC, Hoda F, Arranz MJ, Li T, Nanko S, Murray RM, McGuffin P, Owen M, Gill M, Collier DA (1997) Catechol-O-

- methyltransferase polymorphisms and schizophrenia: a transmission disequilibrium study in multiply affected families. *Psychiatr Genet* 7:97-101.
- Lajtha A (2007) Interrelated mechanisms in reward and learning. *Neurochem Int*.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991) trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66:967-979.
- Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* 17:7890-7901.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- Lejoyeux M, Mc Loughlin M, Ades J (2000) Epidemiology of behavioral dependence: literature review and results of original studies. *Eur Psychiatry* 15:129-134.
- Leonard S, Bertrand D (2001) Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob Res* 3:203-223.
- Leshner AI, Koob GF (1999) Drugs of abuse and the brain. *Proc Assoc Am Physicians* 111:99-108.
- Lewis MC, Gould TJ (2007) Signal transduction mechanisms within the entorhinal cortex that support latent inhibition of cued fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 88:359-368.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Dillon DJ, Klein DF (1984) Effects of naloxone on patients with panic attacks. *Am J Psychiatry* 141:995-997.
- Likhtik E, Pelletier JG, Paz R, Pare D (2005) Prefrontal control of the amygdala. *J Neurosci* 25:7429-7437.
- Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimaraes FS (2001) Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res Bull* 55:747-754.
- Lissek S, Gunturkun O (2003) Dissociation of extinction and behavioral disinhibition: the role of NMDA receptors in the pigeon associative forebrain during extinction. *J Neurosci* 23:8119-8124.

- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Lopez B, Turner RJ, Saavedra LM (2005) Anxiety and risk for substance dependence among late adolescents/young adults. *J Anxiety Disord* 19:275-294.
- Lubman DI, Allen NB, Rogers N, Cementon E, Bonomo Y (2007) The impact of co-occurring mood and anxiety disorders among substance-abusing youth. *J Affect Disord* 103:105-112.
- Lydiard RB (2003) The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 3:21-27.
- Mac LP (1949) Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med* 11:338-353.
- MacDonald JF, Jackson MF, Beazely MA (2006) Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol* 18:71-84.
- Maldonado R (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 21:91-104.
- Maldonado R, Koob GF (1993) Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. *Brain Res* 605:128-138.
- Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF (1992) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 261:669-677.
- Maldonado R, Dauge V, Callebert J, Villette JM, Fournie-Zaluski MC, Feger J, Roques BP (1989) Comparison of selective and complete inhibitors of enkephalin-degrading enzymes on morphine withdrawal syndrome. *Eur J Pharmacol* 165:199-207.
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, Schutz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273:657-659.

- Maremmani I, Marini G, Fornai F (1998) Naltrexone-induced panic attacks. *Am J Psychiatry* 155:447.
- Mattay VS, Goldberg TE, Fera F, Hariri AR, Tessitore A, Egan MF, Kolachana B, Callicott JH, Weinberger DR (2003) Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6186-6191.
- May-Simera H, Levin ED (2003) NMDA systems in the amygdala and piriform cortex and nicotinic effects on memory function. *Brain Res Cogn Brain Res* 17:475-483.
- McDonough J, Deneris E (1997) beta4<sup>3'</sup>: An enhancer displaying neural-restricted activity is located in the 3'-untranslated exon of the rat nicotinic acetylcholine receptor beta4 gene. *J Neurosci* 17:2273-2283.
- McDougle CJ, Black JE, Malison RT, Zimmermann RC, Kosten TR, Heninger GR, Price LH (1994) Noradrenergic dysregulation during discontinuation of cocaine use in addicts. *Arch Gen Psychiatry* 51:713-719.
- McGregor LM, Baylín SB, Griffin CA, Hawkins AL, Nelkin BD (1994) Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics* 22:267-272.
- McIntyre CK, Hatfield T, McGaugh JL (2002) Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur J Neurosci* 16:1223-1226.
- Meil WM, See RE (1997) Lesions of the basolateral amygdala abolish the ability of drug associated cues to reinstate responding during withdrawal from self-administered cocaine. *Behav Brain Res* 87:139-148.
- Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H (1992) Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51:513-532.
- Moghaddam B, Homayoun H (2008) Divergent plasticity of prefrontal cortex networks. *Neuropsychopharmacology* 33:42-55.

- Moore RY, Bloom FE (1979) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2:113-168.
- Morimoto K (1989) Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 13:253-260.
- Mucha RF, Gritti MD, Kim C (1986) Aversive properties of opiate withdrawal studied in rats. *NIDA Res Monogr* 75:567-570.
- Nader K, LeDoux JE (1999) Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav Neurosci* 113:891-901.
- Nakamura S (1991) Axonal sprouting of noradrenergic locus coeruleus neurons following repeated stress and antidepressant treatment. *Prog Brain Res* 88:587-598.
- Naqvi NH, Rudrauf D, Damasio H, Bechara A (2007) Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science* 315:531-534.
- Narita M, Soma M, Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T (2000) Implications of the NR2B subunit-containing NMDA receptor localized in mouse limbic forebrain in ethanol dependence. *Eur J Pharmacol* 401:191-195.
- Nemeroff CB (2003) The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 37:133-146.
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12:2439-2450.
- Nestler EJ (2001) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10:201-217.
- Nestler EJ (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78:637-647.
- Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25:210-218.

- Netter P, Toll C, Lujic C, Reuter M, Hennig J (2002) Addictive and nonaddictive smoking as related to responsivity to neurotransmitter systems. *Behav Pharmacol* 13:441-449.
- Neumeister A, Daher RJ, Charney DS (2005) Anxiety disorders: noradrenergic neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*:205-223.
- Nolan PM, Peters J, Vizor L, Strivens M, Washbourne R, Hough T, Wells C, Glenister P, Thornton C, Martin J, Fisher E, Rogers D, Hagan J, Reavill C, Gray I, Wood J, Spurr N, Browne M, Rastan S, Hunter J, Brown SD (2000) Implementation of a large-scale ENU mutagenesis program: towards increasing the mouse mutant resource. *Mamm Genome* 11:500-506.
- Numan S, Seroogy KB (1999) Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 403:295-308.
- Numan S, Lane-Ladd SB, Zhang L, Lundgren KH, Russell DS, Seroogy KB, Nestler EJ (1998) Differential regulation of neurotrophin and trk receptor mRNAs in catecholaminergic nuclei during chronic opiate treatment and withdrawal. *J Neurosci* 18:10700-10708.
- Nutt DJ (1989) Altered central alpha 2-adrenoceptor sensitivity in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 46:165-169.
- Obinu MC, Reibaud M, Miquet JM, Pasquet M, Rooney T (2002) Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances ACh transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:913-918.
- Ochoa Mangado E (1999) [Anxiety disorders and substance-related disorders]. *Actas Esp Psiquiatr* 27:56-63.
- Olmstead MC (2006) Animal models of drug addiction: Where do we go from here? *Q J Exp Psychol (Colchester)* 59:625-653.
- Orellana Vidal GP (1995) [Locus coeruleus: implications for psychiatry]. *Acta Psiquiatr Psicol Am Lat* 41:57-66.

- Osterhout CA, Sterling CR, Chikaraishi DM, Tank AW (2005) Induction of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of transgenic mice in response to stress or nicotine treatment: lack of activation of tyrosine hydroxylase promoter activity. *J Neurochem* 94:731-741.
- Pandey SC, Zhang H, Roy A, Misra K (2006) Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *J Neurosci* 26:8320-8331.
- Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J Neurosci* 28:2589-2600.
- Papez JW (1995) A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7:103-112.
- Pare D, Collins DR (2000) Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J Neurosci* 20:2701-2710.
- Parfitt DB, Levin JK, Saltstein KP, Klayman AS, Greer LM, Helmreich DL (2004) Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. *Brain Res* 1016:111-118.
- Park S, Knopick C, McGurk S, Meltzer HY (2000) Nicotine impairs spatial working memory while leaving spatial attention intact. *Neuropsychopharmacology* 22:200-209.
- Passerin AM, Cano G, Rabin BS, Delano BA, Napier JL, Sved AF (2000) Role of locus coeruleus in foot shock-evoked Fos expression in rat brain. *Neuroscience* 101:1071-1082.
- Pattij T, Janssen MC, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN, van Gaalen MM (2007) Involvement of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell in inhibitory response control. *Psychopharmacology (Berl)* 191:587-598.
- Paylor R, Nguyen M, Crawley JN, Patrick J, Beaudet A, Orr-Urtreger A (1998) Alpha7 nicotinic receptor subunits are not necessary for hippocampal-



- dependent learning or sensorimotor gating: a behavioral characterization of Acra7-deficient mice. *Learn Mem* 5:302-316.
- Petracca A, Michelini S, Perugi G, Cassano GB (1991) [Benzodiazepine withdrawal syndrome. Problems of differential diagnosis against depression, panic attacks and generalized anxiety]. *Clin Ter* 137:191-197.
- Piazza PV, Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19:67-74.
- Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ (2002) Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport* 13:1097-1106.
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401-404.
- Pitman RK (1997) Overview of biological themes in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 821:1-9.
- Pohl R, Yeragani VK, Balon R, Lycaki H, McBride R (1992) Smoking in patients with panic disorder. *Psychiatry Res* 43:253-262.
- Poling J, Kosten TR, Sofuoglu M (2007) Treatment outcome predictors for cocaine dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse* 33:191-206.
- Portugal GS, Kenney JW, Gould TJ (2008) Beta2 subunit containing acetylcholine receptors mediate nicotine withdrawal deficits in the acquisition of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 89:106-113.
- Power AE, McGaugh JL (2002) Phthalic acid amygdalopetal lesion of the nucleus basalis magnocellularis induces reversible memory deficits in rats. *Neurobiol Learn Mem* 77:372-388.
- Pratt JA (1992) The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther* 55:149-181.
- Preuss UW, Soyka M, Bahlmann M, Wenzel K, Behrens S, de Jonge S, Kruger M, Bondy B (2000) Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism (5-HTTLPR), [3H]paroxetine binding in healthy control subjects and alcohol-dependent patients and their relationships to impulsivity. *Psychiatry Res* 96:51-61.

- Priolo E, Libri V, Lopilato R, David E, Nappi G, Nistico G (1991) Panic-like attack induced by microinfusion into the locus coeruleus of antagonists and inverse agonists at GABAA-receptors in rodents. *Funct Neurol* 6:393-403.
- Protopopescu X, Pan H, Tuescher O, Cloitre M, Goldstein M, Engeli A, Yang Y, Gorman J, LeDoux J, Stern E, Silbersweig D (2006) Increased brainstem volume in panic disorder: a voxel-based morphometric study. *Neuroreport* 17:361-363.
- Przybylski J, Roulet P, Sara SJ (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623-6628.
- Quirk GJ, Gehlert DR (2003) Inhibition of the amygdala: key to pathological states? *Ann N Y Acad Sci* 985:263-272.
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L (1996) Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380:347-351.
- Rasmussen K (1991) Afferent effects on locus coeruleus in opiate withdrawal. *Prog Brain Res* 88:207-216.
- Rasmussen K (1995) The role of the locus coeruleus and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 13:295-300.
- Rasmussen K, Aghajanian GK (1989) Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis. *Brain Res* 505:346-350.
- Rasmussen K, Beitner-Johnson DB, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J Neurosci* 10:2308-2317.
- Regier DA, Rae DS, Narrow WE, Kaelber CT, Schatzberg AF (1998) Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders. *Br J Psychiatry Suppl*:24-28.

- Reimer DR, Mohan J, Nagaswami S (1975) Temporal lobe epilepsy as a probable manifestation of limbic system dysfunction. *Bull Menninger Clin* 39:357-363.
- Resstel LB, de Aguiar Correa FM, Silveira Guimaraes F (2007) The Expression of Contextual Fear Conditioning Involves Activation of an NMDA Receptor Nitric Oxide Pathway in the Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*.
- Rhodes SE, Killcross S (2004) Lesions of rat infralimbic cortex enhance recovery and reinstatement of an appetitive Pavlovian response. *Learn Mem* 11:611-616.
- Richter RM, Weiss F (1999) In vivo CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse* 32:254-261.
- Robinson S, Sandstrom SM, Denenberg VH, Palmiter RD (2005) Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav Neurosci* 119:5-15.
- Robinson SR, Moody CA, Spear LP, Smotherman WP (1993) Effects of dopamine and kappa opioid receptors on fetal responsiveness to perioral stimuli. *Dev Psychobiol* 26:37-50.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291.
- Rodriguez de Fonseca F, Roberts AJ, Bilbao A, Koob GF, Navarro M (1999) Cannabinoid receptor antagonist SR141716A decreases operant ethanol self administration in rats exposed to ethanol-vapor chambers. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20:1109-1114.
- Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 8:711-713.
- Rondina Rde C, Gorayeb R, Botelho C (2007) Psychological characteristics associated with tobacco smoking behavior. *J Bras Pneumol* 33:592-601.
- Rosenkranz JA, Grace AA (2002) Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* 22:324-337.

- Rosenkranz JA, Moore H, Grace AA (2003) The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J Neurosci* 23:11054-11064.
- Ross SA, Wong JY, Clifford JJ, Kinsella A, Massalas JS, Horne MK, Scheffer IE, Kola I, Waddington JL, Berkovic SF, Drago J (2000) Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *J Neurosci* 20:6431-6441.
- Rothe C, Koszycki D, Bradwejn J, King N, Deluca V, Tharmalingam S, Macciardi F, Deckert J, Kennedy JL (2006) Association of the Val158Met catechol O-methyltransferase genetic polymorphism with panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 31:2237-2242.
- Rounsaville BJ, Spitzer RL, Williams JB (1986) Proposed changes in DSM-III substance use disorders: description and rationale. *Am J Psychiatry* 143:463-468.
- Rounsaville BJ, Weissman MM, Kleber H, Wilber C (1982a) Heterogeneity of psychiatric diagnosis in treated opiate addicts. *Arch Gen Psychiatry* 39:161-168.
- Rounsaville BJ, Weissman MM, Crits-Christoph K, Wilber C, Kleber H (1982b) Diagnosis and symptoms of depression in opiate addicts. Course and relationship to treatment outcome. *Arch Gen Psychiatry* 39:151-156.
- Royer S, Martina M, Pare D (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci* 19:10575-10583.
- Sahun I, Delgado-Garcia JM, Amador-Arjona A, Giralt A, Alberch J, Dierssen M, Gruart A (2007a) Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *J Neurosci* 27:2253-2260.
- Sahun I, Gallego X, Gratacos M, Murtra P, Trullas R, Maldonado R, Estivill X, Dierssen M (2007b) Differential responses to anxiogenic drugs in a mouse model of panic disorder as revealed by Fos immunocytochemistry in specific areas of the fear circuitry. *Amino Acids* 33:677-688.

- Saitoh A, Yoshikawa Y, Onodera K, Kamei J (2005) Role of delta-opioid receptor subtypes in anxiety-related behaviors in the elevated plus-maze in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 182:327-334.
- Salas R, Pieri F, De Biasi M (2004a) Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Neurosci* 24:10035-10039.
- Salas R, Cook KD, Bassetto L, De Biasi M (2004b) The alpha3 and beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunits are necessary for nicotine-induced seizures and hypolocomotion in mice. *Neuropharmacology* 47:401-407.
- Salas R, Orr-Urtreger A, Broide RS, Beaudet A, Paylor R, De Biasi M (2003) The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. *Mol Pharmacol* 63:1059-1066.
- Salas R, Pieri F, De Biasi M (2004) Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Neurosci* 24:10035-10039.
- Salas R, Pieri F, Fung B, Dani JA, De Biasi M (2003) Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. *J Neurosci* 23:6255-6263.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schilstrom B, Nomikos GG, Nisell M, Hertel P, Svensson TH (1998) N-methyl-D-aspartate receptor antagonism in the ventral tegmental area diminishes the systemic nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82:781-789.
- Schlaepfer IR, Hoft NR, Collins AC, Corley RP, Hewitt JK, Hopfer CJ, Lessem JM, McQueen MB, Rhee SH, Ehringer MA (2008) The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biol Psychiatry* 63:1039-1046.
- Schulteis G, Yackey M, Risbrough V, Koob GF (1998) Anxiogenic-like effects of spontaneous and naloxone-precipitated opiate withdrawal in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 60:727-731.

- Schultz W, Dickinson A (2000) Neuronal coding of prediction errors. *Annu Rev Neurosci* 23:473-500.
- Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR (2003) Changes in behavior-related neuronal activity in the striatum during learning. *Trends Neurosci* 26:321-328.
- Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F (2008) Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav Brain Res* 187:304-311.
- Selley DE, Nestler EJ, Breivogel CS, Childers SR (1997) Opioid receptor-coupled G-proteins in rat locus coeruleus membranes: decrease in activity after chronic morphine treatment. *Brain Res* 746:10-18.
- Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM, Guthrie KM, Isackson PJ, Gall CM (1994) Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* 342:321-334.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003) The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)* 168:3-20.
- Shaikh SA, Strauss J, King N, Bulgin NL, Vetro A, Kiss E, George CJ, Kovacs M, Barr CL, Kennedy JL (2008) Association study of serotonin system genes in childhood-onset mood disorder. *Psychiatr Genet* 18:47-52.
- Shalev U, Grimm JW, Shaham Y (2002) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev* 54:1-42.
- Shearman E, Rossi S, Sershen H, Hashim A, Lajtha A (2005) Locally administered low nicotine-induced neurotransmitter changes in areas of cognitive function. *Neurochem Res* 30:1055-1066.
- Shekhar A, Sajdyk TJ, Gehlert DR, Rainnie DG (2003) The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. *Ann N Y Acad Sci* 985:308-325.
- Shekhar JAHA (2003) Developmental Aspects of Panic and Related Anxiety Disorders. *Neuroembryology* 2:72-80.

- Shiffman S, Ferguson SG, Gwaltney CJ (2006) Immediate hedonic response to smoking lapses: relationship to smoking relapse, and effects of nicotine replacement therapy. *Psychopharmacology (Berl)* 184:608-618.
- Shrier LA, Harris SK, Kurland M, Knight JR (2003) Substance use problems and associated psychiatric symptoms among adolescents in primary care. *Pediatrics* 111:e699-705.
- Simkin DR (2002) Adolescent substance use disorders and comorbidity. *Pediatr Clin North Am* 49:463-477.
- Simmons DA, Brooks BM, Neill DB (2007) GABAergic inactivation of basolateral amygdala alters behavioral processes other than primary reward of ventral tegmental self-stimulation. *Behav Brain Res* 181:110-117.
- Sinha R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158:343-359.
- Sinha R, Talih M, Malison R, Cooney N, Anderson GM, Kreek MJ (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology (Berl)* 170:62-72.
- Sinha SS, Goetz RR, Klein DF (2007) Physiological and behavioral effects of naloxone and lactate in normal volunteers with relevance to the pathophysiology of panic disorder. *Psychiatry Res* 149:309-314.
- Sklair-Tavron L, Nestler EJ (1995) Opposing effects of morphine and the neurotrophins, NT-3, NT-4, and BDNF, on locus coeruleus neurons in vitro. *Brain Res* 702:117-125.
- Smith CB, Hollingsworth PJ, Geer JJ, Moises HC (1983) Changes in alpha2 adrenoreceptors in various areas of the rat brain after long-term administration of "mu" and "kappa" opiate agonists. *Life Sci* 33 Suppl 1:369-372.
- Smith DG, Qi H, Svenningsson P, Wade M, Davis RJ, Gehlert DR, Nomikos GG (2008) Behavioral and biochemical responses to d-amphetamine in MCH1 receptor knockout mice. *Synapse* 62:128-136.

- Southwick SM, Bremner JD, Rasmusson A, Morgan CA, 3rd, Arnsten A, Charney DS (1999) Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 46:1192-1204.
- Stein EA, Pankiewicz J, Harsch HH, Cho JK, Fuller SA, Hoffmann RG, Hawkins M, Rao SM, Bandettini PA, Bloom AS (1998) Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study. *Am J Psychiatry* 155:1009-1015.
- Stewart J (2003) Stress and relapse to drug seeking: studies in laboratory animals shed light on mechanisms and sources of long-term vulnerability. *Am J Addict* 12:1-17.
- Swan GE, Lessov-Schlaggar CN (2007) The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychol Rev* 17:259-273.
- Sziraki I, Sershen H, Hashim A, Lajtha A (2002) Receptors in the ventral tegmental area mediating nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neurochem Res* 27:253-261.
- Szot P, White SS, Greenup JL, Leverenz JB, Peskind ER, Raskind MA (2006) Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *J Neurosci* 26:467-478.
- Talmage DA (2008) Mechanisms of neuregulin action. *Novartis Found Symp* 289:74-84; discussion 84-93.
- Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H (2000) Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 405:397-406.
- Tanis KQ, Duman RS, Newton SS (2008) CREB binding and activity in brain: regional specificity and induction by electroconvulsive seizure. *Biol Psychiatry* 63:710-720.
- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K,



- Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsater A, Flex A, Aben KK, de Vegt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfinngsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2008) A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 452:638-642.
- Tjounmakaris SI, Rudoy C, Peoples J, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ (2003) Cellular interactions between axon terminals containing endogenous opioid peptides or corticotropin-releasing factor in the rat locus coeruleus and surrounding dorsal pontine tegmentum. *J Comp Neurol* 466:445-456.
- Tokuyama S, Zhu H, Wakabayashi H, Feng YZ, Ho IK (1998) The role of glutamate in the locus coeruleus during opioid withdrawal and effects of H-7, a protein kinase inhibitor, on the action of glutamate in rats. *J Biomed Sci* 5:45-53.
- Uhl GR, Drgon T, Johnson C, Fatusin OO, Liu QR, Contoreggi C, Li CY, Buck K, Crabbe J (2008) "Higher order" addiction molecular genetics: convergent data from genome-wide association in humans and mice. *Biochem Pharmacol* 75:98-111.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583-587.
- Valentino RJ, Van Bockstaele E (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 583:194-203.
- Valverde O, Mantamadiotis T, Torrecilla M, Ugedo L, Pineda J, Bleckmann S, Gass P, Kretz O, Mitchell JM, Schutz G, Maldonado R (2004) Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 29:1122-1133.
- Van Bockstaele EJ, Menko AS, Drolet G (2001) Neuroadaptive responses in brainstem noradrenergic nuclei following chronic morphine exposure. *Mol Neurobiol* 23:155-171.

- Van Bockstaele EJ, Saunders A, Commons KG, Liu XB, Peoples J (2000) Evidence for coexistence of enkephalin and glutamate in axon terminals and cellular sites for functional interactions of their receptors in the rat locus coeruleus. *J Comp Neurol* 417:103-114.
- van Duinen MA, Schruers KR, Kenis GR, Wauters A, Delanghe J, Griez EJ, Maes MH (2008) Effects of experimental panic on neuroimmunological functioning. *J Psychosom Res* 64:305-310.
- Varea E, Castillo-Gomez E, Gomez-Climent MA, Blasco-Ibanez JM, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, Nacher J (2007) PSA-NCAM expression in the human prefrontal cortex. *J Chem Neuroanat* 33:202-209.
- Vgontzas AN, Kales A, Bixler EO (1995) Benzodiazepine side effects: role of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacology* 51:205-223.
- Wang JC, Gruzca R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, Fox L, Goldstein E, Reyes O, Saccone N, Saccone S, Xuei X, Bucholz K, Kuperman S, Nurnberger J, Jr., Rice JP, Schuckit M, Tischfield J, Hesselbrock V, Porjesz B, Edenberg HJ, Bierut LJ, Goate AM (2008) Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry*.
- Wang XH, Poo MM (1997) Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron* 19:825-835.
- Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR (2001) Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. *Ann N Y Acad Sci* 937:1-26.
- Williams JM, Ziedonis D (2004) Addressing tobacco among individuals with a mental illness or an addiction. *Addict Behav* 29:1067-1083.
- Wolf ME, Mangiavacchi S, Sun X (2003) Mechanisms by which dopamine receptors may influence synaptic plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1003:241-249.
- Xu X, Scott MM, Deneris ES (2006) Shared long-range regulatory elements coordinate expression of a gene cluster encoding nicotinic receptor heteromeric subtypes. *Mol Cell Biol* 26:5636-5649.

- 
- Yao WD, Spealman RD, Zhang J (2008) Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochem Pharmacol* 75:2055-2069.
- Yeragani VK, Tancer M, Uhde T (2003) Heart rate and QT interval variability: abnormal alpha-2 adrenergic function in patients with panic disorder. *Psychiatry Res* 121:185-196.
- Zai G, Arnold P, Burroughs E, Barr CL, Richter MA, Kennedy JL (2005) Evidence for the gamma-amino-butyric acid type B receptor 1 (GABBR1) gene as a susceptibility factor in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B:25-29.
- Zhang Z, Schulteis G (2008) Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 89:392-403.
- Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47:859-872.
- Zhou XF, Rush RA (1996) Functional roles of neurotrophin 3 in the developing and mature sympathetic nervous system. *Mol Neurobiol* 13:185-197.
- Zhou Y, Spangler R, Yuferov VP, Schlussmann SD, Ho A, Kreek MJ (2004) Effects of selective D1- or D2-like dopamine receptor antagonists with acute "binge" pattern cocaine on corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin mRNA levels in the hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 130:61-67.
- Zhu PJ, Stewart RR, McIntosh JM, Weight FF (2005) Activation of nicotinic acetylcholine receptors increases the frequency of spontaneous GABAergic IPSCs in rat basolateral amygdala neurons. *J Neurophysiol* 94:3081-3091.

## 1.ABREVIATURAS

5HT	Serotonina
5HT1B	Receptor de serotonina tipo 1B
$\alpha$ 2-AR	Receptor alfa-2 adrenérgico
AC	Adenilato Ciclasa
nAChR	Receptor nicotínico
ADNFLE	Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazolepropionic
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AP-5	Anatgonista de receptores NMDA
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo medial de la estria terminalis
CeA	Amígdala central
CE <sub>50</sub>	Concentración eficaz 50
COMT	Catechol-O-methyl transferase
CREB	cAMP response element-binding
CRH	Hormona de liberación de corticotropina
CS	Estímulo condicionado
D1	Receptor de dopamina tipo1
D2	Receptor de dopamina tipo2
DA	Dopamina
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
DOR	Delta opioid receptor
DRD2	Gen del receptor de dopamina tipo 2
DRD4	Gen del receptor de dopamina tipo 4,
DSMIV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
Erb4	Epidermal growth factor receptor tipo 4
FBS	Suero fetal bovino
FosB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
GABA	Gamma-aminobutyric acid

GABAA	Receptor de GABA tipo A
GABAB	Receptor de GABA tipo B
GAD1	Glutamata descarboxilasa tipo 1
HTTLPR	Polimorfismo del gen transportador de serotonina
IMIM	Institut Municipal d'Investigació Mèdica
KOR	Kappa opioid receptor
LA	Amígdala lateral
LC	Locus Coeruleus
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
MAOA	Monoamine oxidase A
MeA	Amígdala medial
MOR	Mu opioid receptor
fMRI	Functional magnetic resonance imaging
NA	Noradrenalina
Nac	Nucleus Accumbens
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NPY	Neuropéptido Y
NR1	Subunidad tipo 1 del receptor de NMDA
NR2A	Subunidad tipo 2A del receptor de NMDA
NR2B	Subunidad tipo 2B del receptor de NMDA
NT-3	Neurotrofina-3
OFC	Corteza orbitofrontal
p75	Receptor de baja afinidad para neurotrofinas
PAG	Sustancia Gris Periacueductal
PBS	Tampón fosfato salino
Pgi	Nucleus Pragigantocellularis
PFA	Paraformaldheído
PFC	Corteza prefrontal
dIPFC	Corteza prefrontal dorsolateral
mPFC	Corteza prefrontal medial
PKA	Proteína quinasa A
PRBB	Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona
SLC6A3	Gen del transportador de dopamina, miembro 3

---

SLC6A4	Gen del transportador de dopamina, miembro 4
SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema nerviosos central
TH	Tirosina hidroxilasa
Trk	Receptor tirosina quinasa
TrkB	Receptor tirosina quinasa B
TrkC	Receptor tirosina quinasa C
US	Estímulo incondicionado
VTA	Área tegmental ventral

## 2. ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

La producción científica derivada de esta Tesis Doctoral queda plasmada en dos artículos originales de investigación pendientes de publicación:

**Gallego X**, Murtra P, Zamalloa T, Canals JM, Pineda J, Amador-Arjona A, Maldonado R and Dierssen M (2008) Deregulation of the opioid system in the locus coeruleus of a mouse model of panic disorder. *En preparación*.

**Gallego X**, Amador-Arjona A, Robles N, Armengol LI, Gratacós M, Sabriá J, Estivill X, Dierssen M (2008) Altered anxiety-related phenotype in BAC transgenic mice overexpressing the  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , and  $\beta 4$  subunits of the nicotinic receptors in brain. *En preparación*.

Además parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados previamente:

Dierssen M, Gratacos M, Sahun I, Martin M, **Gallego X**, Amador-Arjona A, Martinez de Lagran M, Murtra P, Marti E, Pujana MA, Ferrer I, Dalfo E, Martinez-Cue C, Florez J, Torres-Peraza JF, Alberch J, Maldonado R, Fillat C, Estivill X (2006) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkC exhibit increased catecholaminergic neuron density in specific brain areas and increased anxiety-like behavior and panic reaction. *Neurobiol Dis* 24:403-418. (En este artículo he realizado la inmunohistoquímica de TrkC, la inmunofluorescencia doble TH/TrkC y las cuantificaciones de estas neuronas, así como el análisis por western blot de TrkC)

Sahun I, **Gallego X**, Gratacos M, Murtra P, Trullas R, Maldonado R, Estivill X, Dierssen M (2007) Differential responses to anxiogenic drugs in a mouse model of panic disorder as revealed by Fos immunocytochemistry in specific areas of the fear circuitry. *Amino Acids* 33:677-688. (En este artículo he realizado la inmunohistoquímica de c-Fos y los contajes estereológicos de los diferentes núcleos)

También he participado en la realización y redacción de otros artículos y revisiones del laboratorio:

- Gratacos M, Sahun I, **Gallego X**, Amador-Arjona A, Estivill X, Dierssen M (2007) Candidate genes for panic disorder: insight from human and mouse genetic studies. *Genes Brain Behav* 6 Suppl 1:2-23. (En este artículo he participado en la redacción de la parte del trastorno de pánico)
- Martinez de Lagran M, Altafaj X, **Gallego X**, Marti E, Estivill X, Sahun I, Fillat C, Dierssen M (2004) Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiol Dis* 15:132-142. (En este artículo he participado en la realización y análisis del patrón de natación del TgDyrk1a)
- Mercader JM, Saus E, Aguera Z, Bayes M, Boni C, Carreras A, Cellini E, de Cid R, Dierssen M, Escaramis G, Fernandez-Aranda F, Forcano L, **Gallego X**, Gonzalez JR, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Nacmias B, Puig A, Ribases M, Ricca V, Romo L, Sorbi S, Versini A, Gratacos M, Estivill X (2008) Association of NTRK3 and its interaction with NGF suggest an altered cross-regulation of the neurotrophin signaling pathway in eating disorders. *Hum Mol Genet* 17:1234-1244. (En este artículo he participado en la realización de la inmunohistoquímica de TrkC que finalmente no fue incluida en el artículo)

A continuación se adjuntan los artículos más relevantes para el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral.