

TESIS DOCTORAL

**Papel de la Sustancia P  
en la vulnerabilidad a la  
adicción, la neurotoxicidad y  
el estrés**



Eva del Rio Pons

Directora: Dra. Carmen de Felipe Fernández

Instituto de Neurociencias, 2016







Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Universidad Miguel Hernández  
Instituto de Neurociencias

D.<sup>a</sup> Carmen de Felipe Fernández, Catedrático de  
Universidad del Área de Biología Celular de la  
Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que D.<sup>a</sup> Eva del Rio Pons, licenciada en Biología  
por la Universidad de Alicante, ha realizado bajo  
su dirección el trabajo experimental que recoge su  
Tesis Doctoral *“Papel de la Sustancia P en la  
vulnerabilidad a la adicción, la neurotoxicidad y el  
estrés”*.

Que ha revisado los contenidos científicos y los  
aspectos formales del trabajo y da su conformidad  
para su presentación y defensa públicas.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firma  
el presente Certificado en San Juan de Alicante, a  
tres de septiembre de dos mil dieciséis.

Fdo.: D.<sup>a</sup> Carmen de Felipe Fernández





## AGRADECIMIENTOS

Un proverbio hebreo dice: “El que da, no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar” y yo no olvido toda la ayuda y apoyo recibidos durante este largo proceso de elaboración de mi Tesis Doctoral. Por este motivo quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y alentado durante este tiempo:

Carmen, gracias, gracias y mil gracias. Gracias por confiar en mí, por enseñarme y apoyarme en mis proyectos, por tu paciencia y comprensión pero especialmente gracias por estar ahí en todos los momentos, buenos y no tanto. Maestra, consejera, cariñosa, protectora y enormemente generosa conmigo, abriéndome las puertas no sólo de tu laboratorio sino de tu casa y, permitiéndome llevar a cabo una de las mejores experiencias de mi vida, mi estancia en Londres. Estaré aquí siempre que me necesites y deseo, de todo corazón, poder tenerte siempre cerca.

Gracias a los integrantes de CDF's lab: Esther, Marta, Ruth, Trini, Maca, Luis, ahora mis amigos. De todos vosotros guardo imborrables recuerdos que me llenan de felicidad. Pero quiero darle las gracias, especialmente, a Maca. Gracias por tu tiempo, tu paciencia y tu serenidad. Eres una fantástica investigadora y mejor persona. Marta, gracias por el esfuerzo en la evaluación de esta Tesis, sé que para ti ha sido un reto y un esfuerzo que te agradezco enormemente. La gente buena se merece ser feliz y cumplir sus sueños, por eso estoy segura que conseguirás todas las cosas que te propongas.

Thanks to Steve Hunt welcome me into their laboratory and giving me the opportunity to mature scientific and personally. For trust, for making me feel an active part of their group and for their fantastic humor that made me relax and feel more and more comfortable.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de Eugenio Vilanova, habéis sido muchos los que habéis pasado por él durante este tiempo. Dra. Mangas, Dra. Benavent, ahora ya somos tres Doctoras! Os deseo lo mejor en vuestras vidas y que la ciencia os permita participar de ella. No quiero dejar de dar las gracias de forma especial a Eugenio y Miguel Ángel por alentarme y apoyarme para conseguir acabar este trabajo.

Gracias a mis amigas, especialmente a Sara. Gracias por las risas, las charlas, por sacarme de vez en cuando de la rutina para hablar de la vida, del amor, de nuestras inquietudes, nuestros deseos. Gracias por ser el hombro en el que, en ocasiones, necesito apoyarme pero principalmente gracias por estar siempre.

Gracias a mi familia y, especialmente, a mi madre. Mamá, sin ti no lo hubiera conseguido. Gracias por ese amor incondicional de una madre hacia un hijo, que ahora entiendo, gracias por estar siempre ahí, por cuidarme... Te dedico esta Tesis, no por el contenido sino por el esfuerzo y los valores que ella encierra, muchos de los cuales se deben a la educación recibida fruto de tu cariño y tu trabajo. También quiero darles un particular agradecimiento a mis tíos, Mario y Cachito, esta Tesis en parte os la debo porque una vez más, de otras muchas, pensasteis en mí. Aquí está el resultado de vuestra confianza y cariño hacia mí.

*Amore*, gracias por ser, por estar, pero sobretodo por aparecer en mi vida and *"fly me to the moon"*. Gracias por tu serenidad, por tu respeto, tu paciencia y buen humor... *"In other words, I love you"*.

Y por último, quiero disculparme con Manuel, mi hijo, por el tiempo que este trabajo nos ha robado. Sin embargo, espero que este sacrificio sirva de ejemplo de esfuerzo y tenacidad porque la palabra convence pero el ejemplo arrastra.

## ABREVIATURAS

2CB-MFT	4-bromo-2,5-dimetoxifenil anfetamina
5-HIAA	Ácido indolacético
5-HT	Serotonina
5-HT1B	Receptor de serotonina 1B
5-HTT	Transportador de 5-HT
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATV	Área tegmental ventral
AVP	Péptidos arginina-vasopresina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BLA	Amígdala basolateral
BP	"Breaking Point" o punto de corte
CAD	Cuadrante adyacente derecho
CAI	Cuadrante adyacente izquierdo
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina Proteína Kinasa II
CBG	Transcortina o globulina de unión a corticosteroides
CD	Cuadrante diana
Cdk5	Quinasa dependiente de ciclina 5
cDNA	AND complementario
CO	Cuadrante opuesto
COMT	Catecolmetiltransferasa
CORT	Corticosterona
CPF	Corteza prefrontal
CPP	Ensayo de preferencia de plaza condicionada
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRFR1	Receptor 1 del factor liberador de corticotropina
CRFR2	Receptor 2 del factor liberador de corticotropina
CV	Coefficiente de varianza
CYP2D6	Enzima del complejo enzimático citocromo P450
D	Período en el que la droga está disponible
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DEA	Drug Enforcement Agency
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DOB	4-bromo-2,5-dimetoxi anfetamina
DOM	4-metil-2,5 dimetoxi anfetamina
DOPAC	3,4-dihidroxifenilacético
EC	Estímulo condicionado
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EKA	Endoquinina A
EKB	Endoquinina B

EKC	Endoquinina C
EKD	Endoquinina D
EPM	Laberinto en cruz elevado
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FR	Programa de autoadministración de razón fija
GDP	Guanosín difosfato
GEE	Ecuaciones estructurales generalizadas
GHB	Gamma-hidroxi-butilato
GLM	Modelo lineal general
GluR2	Subunidad 2 del receptor AMPA de glutamato
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GPx	Enzima glutatión peroxidasa
GRs	Receptores de glucocorticoides tipo II o glucocorticoides
GzLM	Modelo lineal generalizado
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico
HHA	3,4-dihidroxianfetamina
HHMA	3,4-dihidroximetanfetamina
Hip	Hipocampo
HK1	Hemoquinina-1
HMA	4-hidroxi-3-metoxianfetamina
HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Horseradish peroxidase protein
HVA	Ácido homovalínico
I.C.	Administración intracerebral
ICV	Intracerebroventricular
IEGs	Genes de expresión temprana
IP	Vía intraperitoneal
IP <sub>3</sub>	Inositol trisfosfato
IV	Vía intravenosa
LDT	Tegmento laterodorsal
MC2-R	Receptor de membrana de melanocortina tipo 2
mCPF	Corteza prefrontal medial
MDA	3,4-metilenodioxi anfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxi etilamfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
METH	Metanfetamina
MRs	Receptores de glucocorticoides tipo I o mineralocorticoides
MWM	Laberinto de agua de Morris
NAC	Núcleo accumbens
NBM	Núcleo basalis magnocellularis
ND	Período en el que la droga no está disponible
NK1	Receptor neuroquinina-1
NK1-/-	Animales knockout para el receptor NK1
NK1+/+	Animales silvestres para el receptor NK1
NK1R	Receptor NK1
NK2	Receptor neuroquinina-2
NK3	Receptor neuroquinina-3
NKA	Neuroquinina A
NKB	Neuroquinina B
NoS	No significativo
NPK	Neuropéptido K (NPK)

NP $\gamma$	Neuropéptido $\gamma$
NS	Animales no sensibilizadores
Nurr1	Receptor nuclear asociado 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	P valor
PB	Tampón fosfato
PB	Tampón fosfato 0.1M, pH 7.4
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PMA	Parametoxi anfetamina
POMC	Proopiomelanocortina
POMC	Proopiomelanocortina
PPT-A	Gen preprotaquiquinina-A
PPT-B	Gen preprotaquiquinina-B
PPT-C	Gen preprotaquiquinina-C
pPVN	Región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo
pPVN	Región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo
PR	Programa de autoadministración de razón progresiva
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
r	Coefficiente de correlación de Pearson
RIA	Radioinmunoanálisis
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
S	Animales sensibilizadores
S.C.	Vía subcutánea
SEM	Error estándar de la media
SMA	Eje o sistema simpático-médulo-adrenal
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD	Enzima superóxido dismutasa
SP	Sustancia P
SPSS	Statistical Program for Social Science
ST	Estriado
TH	Tiroxina hidroxilasa
THC	$\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol
TKs	Taquiquininas
TMA-2	2,4,5-trimetoxi anfetamina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
$\Delta$ FosB	Forma truncada de FosB



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL. TAQUIQUININAS: SP Y SU RECEPTOR NK1</b>	<b>1</b>
1. Familia de las Taquiquininas	3
2. La Sustancia P	5
3. Funciones de la sustancia P	5
4. Receptores de Taquiquininas	9
5. El receptor NK1 (NK1R)	12
<b>CAPÍTULO I. LA SENSIBILIZACIÓN MOTORA COMO FACTOR DE VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN: MODULACIÓN POR SP</b>	<b>15</b>
LOCOMOTOR SENSITIZATION AS A FACTOR OF VULNERABILITY IN ADDICTION: THE ROLE OF SUBSTANCE P	17
Abstract and conclusions	17
INTRODUCCIÓN	19
1. Proceso de adicción	21
2. Sustrato neurobiológico de la adicción	22
2.1. Circuito neuronal de recompensa	22
2.2. Receptores dopaminérgicos	24
2.3. Modulación del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico	25
3. Teorías de la adicción	27
3.1. Teoría “general” de la transición a la adicción	29
3.2. Teoría de la sensibilización incentivante	30
4. Sensibilización inducida por drogas	31
5. Sensibilización motora como factor de vulnerabilidad a la adicción	34
6. Modelos animales de adicción a drogas de abuso	36
6.1. Condicionamiento espacial	36
6.2. Condicionamiento operante o instrumental	39
6.3. Modelos animales de adicción basados en criterios diagnósticos	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. Animales de experimentación	53
2. Sensibilización motora	53
3. Autoadministración de morfina	55
4. Análisis de la expresión génica	60
5. Análisis estadístico	63
RESULTADOS	65
1. Sensibilización locomotora inducida por cocaína en animales NK1+/+ y NK1-/-	67
2. Clasificación de la población según el grado de	68

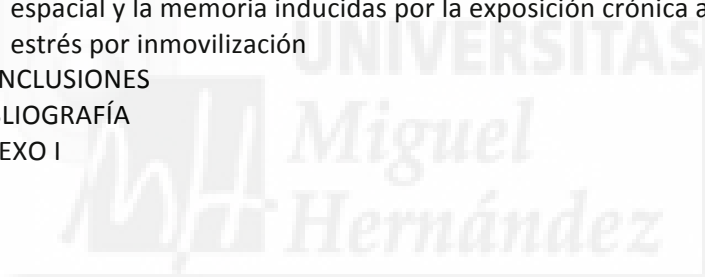
sensibilización locomotora inducida por cocaína en animales NK1+/+ y NK1-/-	
3. Sensibilización locomotora inducida por morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-	70
4. Clasificación de la población según el grado de sensibilización locomotora inducida por morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-	72
5. Autoadministración de recompensantes naturales en animales NK1+/+ y NK1-/- y relación con la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina	74
6. Autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-	77
7. Correlación sensibilización motora <i>versus</i> motivación por morfina	79
8. Relación entre la sensibilización locomotora inducida por morfina y los cambios en las expresión génica en el nucleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal	81
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
1. Adquisición y expresión de la sensibilización locomotora inducida por cocaína y morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-	91
2. Vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina y cocaína. Implicación de la SP	94
3. Autoadministración de recompensantes naturales en animales NK1+/+ y NK1-/- y relación con la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina	97
4. Autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-	98
5. Correlación entre la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina y el desarrollo de la adicción	100
6. Cambios en las expresión génica en el nucleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal inducidos por morfina	101
7. Correlación entre la sensibilización locomotora inducida por morfina y los cambios en las expresión génica en el núcleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal	108
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>CAPÍTULO II: IMPLICACIÓN DE LA SP EN LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR MDMA</b>	<b>115</b>
LACK OF NEUROPROTECTION AGAINST DOPAMINERGIC NEUROTOXICITY INDUCED BY MDMA IN NK1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE	117
Abstract and conclusions	117



INTRODUCCIÓN	119
1. Drogas de síntesis	121
2. MDMA	122
2.1. Antecedentes históricos	122
2.2. Estructura química	123
2.3. Farmacocinética	124
2.4. Efectos agudos del MDMA en ratones	126
2.4.1. Efectos neuroquímicos	126
2.4.2. Efectos en la temperatura corporal	126
2.4.3. Efectos en la actividad locomotora	127
2.5. Efectos a largo plazo del MDMA en ratones	127
2.5.1. Efectos neuroquímicos	127
2.5.2. Efectos funcionales	128
2.6. Mecanismos de neurotoxicidad	128
2.6.1. Hipertermia	129
2.6.2. Metabolito tóxico de la MDMA	130
2.6.3. Estrés oxidativo	131
2.7. Propiedades recompensantes	132
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	133
MATERIALES Y MÉTODOS	137
1. Animales de experimentación	139
2. Medida de la temperatura corporal	139
3. Actividad locomotora	140
4. Ensayo luz-oscuridad	141
5. Análisis de la concentración de DA y sus metabolitos en estriado mediante HPLC	141
6. Western Blot del Transportador de Dopamina	142
7. Inmunohistoquímica del Transportador de Dopamina	143
8. Autorradiografía del Transportador de Dopamina	144
9. Ensayo de preferencia de plaza condicionada	145
10. Análisis estadístico	146
RESULTADOS	147
1. Efecto de la administración tóxica de MDMA sobre la temperatura corporal en animales NK1+/+ y NK1-/-	149
2. Efecto del MDMA sobre la actividad locomotora en animales NK1+/+ y NK1-/-	152
3. Efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la ansiedad medida en el ensayo luz-oscuridad en animales NK1+/+ y NK1-/-	153
4. Efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la concentración estriatal de DA y sus metabolitos en animales NK1+/+ y NK1-/-	155
5. Efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la densidad estriatal del DAT en animales NK1+/+ y	157

NK1-/- analizado mediante western blotting	
6. Estudio inmunohistoquímico de los efectos a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la expresión estriatal del DAT en animales NK1+/+ y NK1-/-	159
7. Estudio autorradiográfico de los efectos a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la densidad estriatal del DAT en animales NK1+/+ y NK1-/-	160
8. Preferencia de plaza condicionada inducida por MDMA	162
DISCUSIÓN	163
1. Implicación de la SP en la hipertermia inducida por la administración tóxica de MDMA	165
2. Implicación de la SP en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la administración tóxica de MDMA	167
3. Implicación de la SP en los efectos a largo plazo sobre la actividad locomotora y la ansiedad inducidos por la administración tóxica de MDMA	170
4. Implicación de la SP en los efectos recompensantes de la MDMA	172
CONCLUSIONES	175
<b>CAPÍTULO III: RESPUESTA ADRENOCORTICAL Y COMPORTAMENTAL AL ESTRÉS CRÓNICO POR INMOBILIZACIÓN EN RATONES NK1-/-</b>	<b>179</b>
ADRENOCORTICAL AND BEHAVIOURAL RESPONSE TO CHRONIC RESTRAINT STRESS IN NEUROKININ-1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE	181
Abstract and conclusions	181
INTRODUCCIÓN	183
1. Concepto de estrés	185
2. El eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal	187
3. Factores liberadores de ACTH: CRF y AVP	188
4. Hormonas periféricas: ACTH y glucocorticoides	190
5. Respuesta al estrés del eje HPA	193
5.1. Curso temporal del eje	193
5.2. Efectos de la intensidad del estímulo	194
5.3. Estrés crónico y adaptación del eje HPA	195
6. SP y regulación del estrés	196
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	199
MATERIALES Y MÉTODOS	203
1. Animales de experimentación	205
2. Inmovilización	205
3. Obtención de muestras de sangre	206
4. Radioinmunoanálisis de corticosterona	206
5. Ensayo luz-oscuridad	207

6. Laberinto de agua de Morris	208
7. Análisis estadístico	209
RESULTADOS	211
1. Efecto del estrés crónico por inmovilización en los niveles de corticosterona plasmática en animales NK1+/+ y NK1-/-	213
2. Efecto del estrés crónico por inmovilización sobre la ansiedad medida en el ensayo luz-oscuridad en animales NK1+/+ y NK1-/-	214
3. Efecto del estrés crónico por inmovilización sobre el aprendizaje espacial medido en el laberinto de agua de Morris en animales NK1+/+ y NK1-/-	216
DISCUSIÓN	219
1. Implicación de la SP en la respuesta del eje HPA a la exposición aguda y crónica a estrés por inmovilización	221
2. Implicación de la SP en las alteraciones sobre la ansiedad inducidas por la exposición crónica a estrés por inmovilización	222
3. Implicación de la SP en las alteraciones sobre el aprendizaje espacial y la memoria inducidas por la exposición crónica a estrés por inmovilización	224
CONCLUSIONES	229
BIBLIOGRAFÍA	233
ANEXO I	283





INTRODUCCIÓN GENERAL.

TAQUIQUININAS: SUSTANCIA P Y SU RECEPTOR NK1



## 1. Familia de las Taquiquininas

Las taquiquininas (TKs) son una familia de pequeños péptidos ampliamente distribuidos en varias especies, desde pequeños invertebrados hasta mamíferos (Severini et al. 2002). Esta familia de péptidos se caracteriza porque están estructuralmente relacionados, ya que mantienen conservada la secuencia carboxi-terminal Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, esencial para la entrada a las vías de transducción de señal y la generación de respuestas a diferentes estímulos. Si bien, el descubrimiento de dos nuevas TKs, las endoquininas C y D (EKC y EKD), ha revelado la existencia de una secuencia del extremo C-terminal parcialmente distinta, Phe-X-Gly-Leu-Leu-NH<sub>2</sub> (Page 2004). En cuanto a la secuencia amino-terminal es diferente para cada péptido y, determina la especificidad del receptor (Krause, Takeda, Hershey 1992) lo que genera numerosas secuencias de taquiquininas distintas.

La diversidad de péptidos existentes que pertenecen a la familia de las taquiquininas de mamífero se debe por un lado, a la existencia de distintos genes que codifican para estos péptidos y por otro, a mecanismos de procesamiento alternativo del ácido ribonucleico (ARN) y de post-traducción diferencial. La transcripción del gen humano preprotaquiquinina-A (PPT-A), que consta de 7 exones, genera un pre ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que puede sufrir procesamiento alternativo dando lugar a cuatro isoformas de ARNm que difieren en su combinación de exones:  $\alpha$ -PPT-A (sin el sexto exón),  $\beta$ -PPT-A (que contiene los siete exones del gen PPT-A),  $\gamma$ -PPT-A (sin el cuarto exón) y  $\delta$ -PPT-A (sin el cuarto ni el sexto exón). El ARNm de  $\alpha$ -PPT-A da lugar exclusivamente a sustancia P (SP), mientras que del ARNm de  $\beta$ -PPT-A y  $\gamma$ -PPT-A derivan la SP y la neuroquinina A (NKA). Los péptidos K (NPK) y  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) son derivados post-traduccionales de la NKA que presentan su secuencia N-terminal prolongada (Kage et al. 1988; Tatemoto et al. 1985) y, además son biológicamente activos (Burcher et al. 1991a; Carter and Krause 1990; Kage et al. 1988; Saffroy et al. 2003). Por otra parte, el gen preprotaquiquinina-B (PPT-B), que consta de 7 exones, codifica únicamente para la neuroquinina B (NKB) y el gen preprotaquiquinina-C (PPT-C) es un precursor común para la hemoquinina-1 (HK1) y las endoquininas A, B, C y D (EKA, EKB, EKC y EKD).

En la tabla I se muestran las estructuras primarias de algunas de las TKs de mamíferos conocidas hasta el momento. Estos péptidos se caracterizan porque comparten el extremo C-terminal, mostrándose en **negrita** los tres residuos comunes a todas las taquiquininas, **Phe-X-Gly-Leu-X-NH<sub>2</sub>**. La estructura primaria de la SP, NKA y NKB está conservada en todas las especies de mamífero y, por el contrario la secuencia de aminoácidos de la HK1 de rata difiere de la de humanos (Kurtz et al. 2002; Page 2004; Zhang, Bonagamba, Machado 2000).

Tabla I. Taquiquininas de mamíferos: secuencias y genes codificantes (Modificado de Pennefather et al. 2004).

Nombre	Especie	Secuencia	Gen (nombre alternativo)
sustancia P (SP)	Mamíferos	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- <b>Phe-Phe-Gly-Leu</b> -Met-NH <sub>2</sub>	TAC-1 (PPT-A o PPT-I)
neuroquinina A (NKA)	Mamíferos	His-Lys-Thr-Asp-Ser- <b>Phe-Val-Gly-Leu</b> -Met-NH <sub>2</sub>	TAC-1 (PPT-A o PPT-I)
neuroquinina B (NKB)	Mamíferos	Asp-Met-His-Asp-Phe- <b>Phe-Val-Gly-Leu</b> -Met-NH <sub>2</sub>	TAC-3 (PPT-B o PPT-II)
hemoquinina-1 (hHK1)	Humano	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- <b>Phe-Phe-Gly-Leu</b> -Met-NH <sub>2</sub>	TAC-4 (PPT-C)
hemoquinina-1 (HK1)	Rata	Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	TAC-4 (PPT-C)

Los péptidos de la familia de las TKs están ampliamente distribuidos en el Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP) de mamíferos, actuando como neurotransmisores excitatorios. Sin embargo, la expresión de algunos miembros de la familia de las TKs en células no neuronales y tejido no nervioso, como células endoteliales, sistema reproductor, células inmunes e inflamatorias, células musculares y fibroblastos entre otros (Pennefather et al. 2004), revela que las TKs no desempeñan un papel exclusivamente neuropeptídico. La NKB está presente en el SNC (Goubillon et al. 2000; Kangawa et al. 1983; Moussaoui et al. 1992), mientras que SP y NKA se encuentran además, en neuronas sensoriales aferentes primarias (Lundberg 1996; Maggi and Meli 1988; Patak, Pennefather, Story 2000). A nivel periférico, la principal fuente de TKs son los nervios sensoriales sensibles a capsaicina, fibras A $\delta$  y C (Lundberg 1996; Maggi and Meli 1988; Patacchini et al. 1998). Además, se ha demostrado que



las TKs se expresan también en neuronas resistentes a capsaicina presentes en las vías respiratorias (Carr et al. 2002; Hunter, Myers, Undem 2000; Myers, Kajekar, Undem 2002) y en el sistema nervioso entérico de distintas especies (Holzer and Holzer-Petsche 1997; Lomax and Furness 2000).

Los avances en el campo de las TKs han revelado la implicación de estos péptidos en diferentes procesos como la preclampsia (Page 2010), la neuroinmunomodulación (actuando como factores endocrinos o paracrinos) (Kennedy et al. 2003; Lecci and Maggi 2003), como mediadores de la inflamación neurogénica (Cao et al. 1998; De Felipe et al. 1998) y potenciadores del crecimiento de células cancerígenas (Friess et al. 2003; Singh et al. 2000).

## **2. La sustancia P**

La sustancia P es un undecapéptido, identificado por Chang en 1971 (Chang, Leeman, Niall 1971), y cuyo nombre se debe al polvo obtenido tras su proceso de extracción. Éste neuropéptido es producido por terminaciones neuronales aferentes del SNC y SNP y funciona como neurotransmisor y/o neuromodulador en ambos sistemas (Otsuka et al. 1982). Sin embargo, se ha demostrado que la SP se localiza además en otros tejidos periféricos no neuronales. Concretamente, se ha demostrado la expresión de SP células endoteliales humanas (Linnik and Moskowitz 1989; Maggi 1997), en el sistema reproductor humano y de ratón (Chiwakata et al. 1991; Patak et al. 2003; Pintado et al. 2003) y en diferentes tipos de células inmunes e inflamatorias humanas, de rata y ratón (Aliakbari et al. 1987; Lai et al. 1998; Pascual and Bost 1990). Además, este péptido está expresado en células enterocromafines (Simon et al. 1992), células epiteliales (Chu et al. 2000), fibroblastos (Bae et al. 2002) y, en células del músculo liso intestinal y respiratorio (Khan and Collins 1994; Maghni et al. 2003).

## **3. Funciones de la sustancia P**

Como hemos dicho la SP se encuentra ampliamente distribuida tanto en el SNC como en el periférico. Específicamente, se ha demostrado su expresión en diferentes áreas cerebrales como: el rinencéfalo, telencéfalo, ganglios basales, hipocampo, amígdala, áreas septales, diencéfalo, hipotálamo, mesencéfalo, metencéfalo, mielencéfalo y médula espinal (Shults et al.

1984). Esta amplia distribución explica la implicación de la SP en numerosas funciones biológicas (Pernow 1983) que se enumeran a continuación:

### **Papel nociceptivo de la sustancia P**

La SP está implicada en la transmisión del dolor al SNC. Se sabe que tras un fuerte estímulo a nivel periférico la SP, contenida en las terminales de las neuronas sensoriales aferentes primarias, es liberada en el asta dorsal de la médula espinal excitando las neuronas sensoriales de segundo orden. Este papel pronociceptivo de la SP ha conllevado numerosos estudios al respecto. De Felipe et al., (De Felipe et al. 1998) demostraron que los animales carentes del receptor preferencial para la SP, denominado NK1 (neuroquinina-1), presentaban una menor respuesta frente a diferentes estímulos dolorosos intensos como calor, presión mecánica o irritantes químicos.

### **Papel de la sustancia P en la adicción**

La SP participa en los mecanismos recompensantes y motivacionales tanto de las drogas de abuso como de los reforzantes naturales. Se ha demostrado que la administración central de SP en diferentes regiones del cerebro como el núcleo basalis magnocellularis (NBM), el septum medial y el hipotálamo lateral induce efectos recompensantes (Hasenohrl, Gerhardt, Huston 1991; Huston et al. 1993; Nikolaus, Huston, Hasenohrl 1999). Además, el receptor NK1 está altamente expresado en áreas cerebrales del sistema de recompensa donde se median las propiedades motivacionales de los reforzantes naturales y las drogas de abuso. Áreas particularmente ricas en la expresión del receptor NK1 son el estriado dorsal y ventral o núcleo accumbens (NAc); concretamente, el receptor NK1 se expresa en las grandes neuronas colinérgicas de circuito local del NAc (Aubry et al. 1994; Murtra et al. 2000; Nakaya et al. 1994).

Estudios previos del grupo de investigación de la Dra. Carmen de Felipe han demostrado, mediante la utilización de animales knockout para el receptor NK1

(NK1-/-), la implicación de la SP en los efectos recompensantes de las drogas de abuso, en especial en la recompensa opiácea (De Felipe et al. 1998; Murtra et al. 2000). Específicamente, se ha probado que los animales mutantes no desarrollan condicionamiento a morfina en el ensayo de preferencia de plaza condicionada (CPP) aunque si muestran preferencia de lugar a cocaína y comida. Debido a la importante relación entre la estimulación motora de una droga y su capacidad para inducir dependencia (Wise and Bozarth 1987), cabe destacar que la estimulación locomotora inducida por morfina está atenuada en animales NK1-/. Por otra parte, los animales NK1-/- presentan una reducción tanto del síndrome de abstinencia a morfina, como de la aversión condicionada del lugar inducida por naloxona en animales morfino-dependientes (Murtra et al. 2000). Además, la eliminación del receptor NK1 produce una reducción tanto en la sensibilización locomotora inducida por morfina como en la autoadministración de esta droga (Ripley et al. 2002). Todo esto sugiere que la sustancia P está implicada en los mecanismos recompensantes morfínicos y en el desarrollo de la adicción a opiáceos.

### **Papel de la sustancia P en conductas emocionales**

La SP ha sido implicada en comportamientos emocionales y en la regulación de la respuesta al estrés y la ansiedad (Culman et al. 1997; Ebner and Singewald 2006), lo cual se puede explicar por la expresión de este péptido en áreas cerebrales implicadas en estos procesos como el caudado putamen, la amígdala, el núcleo accumbens, el hipocampo y varios núcleos hipotalámicos como el paraventricular (PVN), así como la sustancia gris periacueductal y el locus coeruleus.

Se ha demostrado que la administración de SP aumenta la ansiedad (Bassi et al. 2007a; Bassi et al. 2007b), mientras que el bloqueo del receptor preferencial de la SP, NK1, reduce la ansiedad y la depresión (Dableh et al. 2005; File 1997; Kramer et al. 1998). Aunque la implicación de la SP en la ansiedad es evidente, parecen existir diferencias regionales, ya que dependiendo del área donde sea administrada la SP los efectos difieren (Carvalho et al. 2008). Además, el papel de la SP en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y en la respuesta al estrés es

contradictorio, ya que tanto los trabajos en los que utilizan la administración intracerebroventricular de SP como en los que emplean ratones transgénicos carentes del receptor NK1 como herramienta para el estudio de la respuesta al estrés son contradictorios (Kandere-Grzybowska et al. 2003; Larsen et al. 1993; McCutcheon et al. 2008; Santarelli et al. 2001; Saphier et al. 1994).

### **Papel de la sustancia P en el desarrollo del cáncer**

Las Taquiquininas y sus receptores se han relacionado con el desarrollo y progresión de diferentes neoplasias.

Diversas investigaciones han implicado al gen PPT-A y a los receptores de neuroquininas en el desarrollo del cáncer de mama, proponiendo además a este gen como responsable de la metástasis hacia el hueso en estadios avanzados de la enfermedad, posiblemente por la presencia de dos sitios de unión para el protooncogen Myc (promotor de proliferación) en su región 5' (Mukerji et al. 2005; Singh et al. 2006).

Cabe destacar que no sólo la SP y su receptor preferencial, NK1, están implicados en las vías de proliferación celular; la NKA y el receptor neuroquinina-2 (NK2) también están relacionados con estas vías. Se ha demostrado, tanto in vitro como in vivo, que la utilización de antagonistas de los receptores NK1 y NK2 inhibe de forma efectiva el crecimiento tumoral (Bigioni et al. 2005).

Además, se ha documentado la presencia de receptores NK1 funcionales en tumores cerebrales de origen glial revelando la implicación de la SP en el desarrollo de los mismos (Lazarczyk, Matyja, Lipkowski 2007). La interacción SP-NK1 está relacionada con el desarrollo y progresión de estos gliomas, posiblemente debido a que las células tumorales a través de este péptido son capaces de desarrollar actividad autocrina, estimular citoquinas y activar MAP quinasas (Palma et al. 1999).

## **Papel de la sustancia P a nivel periférico**

Como hemos descrito en el apartado 2 existen numerosas fuentes neuronales y no neuronales de SP a nivel periférico donde ejerce numerosas funciones biológicas. Específicamente, la SP participa en la contracción del músculo liso (intestinal y vías respiratorias), control de la respiración (la administración in vivo de SP produce un incremento de la frecuencia respiratoria), termorregulación, control cardiovascular (potente agente hipotensivo) y émesis (Quartara and Maggi 1998). De hecho, actualmente se utiliza el antagonista del receptor NK1, L-7540303 (aprepitant), como medicamento para prevenir las náuseas y vómitos que pueden producirse tras el tratamiento con quimioterapia para el cáncer (Navari et al. 1999). Además, se ha descrito que la administración exógena de SP favorece la curación de heridas cutáneas (Delgado, McManus, Chambers 2005).

## **4. Receptores de Taquiquininas**

Las Taquiquininas constituyen los ligandos endógenos para los receptores de TKs. Actualmente, sólo se han identificado tres receptores distintos de TKs, denominados neuroquinina-1 (NK1), neuroquinina-2 (NK2) y neuroquinina-3 (NK3).

La identificación y localización de estos receptores se ha llevado a cabo mediante diferentes técnicas: autorradiografía (Shults et al. 1982), hibridación in situ para el estudio del ARNm que codifica para el receptor (Maeno, Kiyama, Tohyama 1993) e inmunohistoquímica (Nakaya et al. 1994). A través de estas técnicas se ha puesto de manifiesto la heterogénea distribución de estos receptores dentro de cada especie. El receptor NK1 (NK1R) está ampliamente expresado tanto en el SNC como en el SNP y se localiza en neuronas, células vasculares endoteliales, músculo, células inmunes, y otros (Lai et al. 1998; Patacchini and Maggi 2001; Stewart-Lee and Burnstock 1989; Tsuchida et al. 1990). El receptor NK2 se expresa principalmente en tejidos periféricos, mientras que su expresión en el SNC está restringida a áreas cerebrales específicas (Crocì et al. 1998; Naline et al. 1989; Pennefather et al. 1993; Saffroy et al. 2003; Tsuchida et al. 1990). Por el contrario, el receptor NK3 se localiza sobre todo en el SNC y sólo se ha detectado en determinados tejidos periféricos como el útero

humano y de rata, el músculo esquelético humano, pulmón e hígado, las venas porta y mesentérica de rata, y en neuronas del Sistema Nervioso Entérico de distintas especies (Fioramonti et al. 2003; Lecci and Maggi 2003; Massi, Panocka, de Caro 2000; Patak et al. 2003; Tsuchida et al. 1990).

Los receptores de TKs de mamífero están codificados por tres genes estructuralmente similares, con 5 exones y 4 intrones situados en la misma posición (Hershey, Dykema, Krause 1991; Krause et al. 1993). Dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), los receptores de TKs son de los pocos que conservan intrones por lo que se ha hipotetizado sobre su importancia. Esta retención de intrones, favorece que mediante mecanismos de procesamiento alternativo, se generen isoformas o variantes de estos receptores funcional y/o estructuralmente distintas (Minneman 2001). Del mismo modo, la existencia de diferentes exones favorece la expansión de la familia de receptores de taquiquininas ya que esto puede conllevar a la generación de distintas isoformas con diferentes conformaciones y afinidades por los distintos ligandos endógenos. Se ha demostrado la existencia de algunas isoformas del receptor NK1 que difieren en la longitud del extremo C-terminal; la isoforma completa (407 aminoácidos) que es la predominante en cerebro humano y la isoforma truncada (311 aminoácidos) que es la más abundante en los tejidos periféricos y cuya función biológica es controvertida (variante expresada en numerosas líneas celulares de glioma) (Caberlotto et al. 2003).

Los receptores de TKs pertenecen a la superfamilia de GPCRs y, constituyen una familia de receptores de membrana con una estructura homóloga: 7 dominios hidrofóbicos transmembrana con el extremo amino en la parte extracelular y el carboxilo en la parte citoplasmática (Patacchini and Maggi 1995) (ver figura 1). Además, cabe destacar la elevada homología en la secuencia de los receptores de TKs entre diferentes especies (92% de homología entre el NK1R humano y de rata).

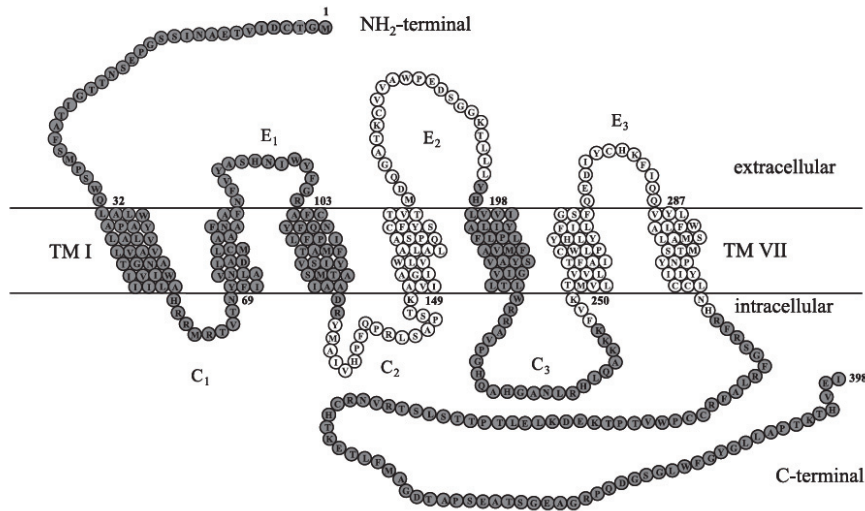


Imagen tomada de Pennefather et al., 2004

**Figura 1. Estructura del receptor NK2 humano.** Presenta siete segmentos transmembrana (TM I-VII) con el extremo NH<sub>2</sub>-terminal en la parte extracelular y el C-terminal en la parte citoplasmática, 3 bucles extracelulares (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>) y 3 bucles intracelulares (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>).

Los péptidos SP, NKA y NKB son capaces de interactuar con los tres receptores de TKs aunque muestran una mayor afinidad para el receptor NK1, NK2 y NK3, respectivamente (Tabla II) (Lecci and Maggi 2003; Maggi 2000; Mussap, Geraghty, Burcher 1993; Regoli, Boudon, Fauchere 1994).

El orden en la afinidad de unión al receptor NK1 es SP > NKA > NKB; mientras que para el receptor NK2 es NKA > NKB > SP y NKB > NKA > SP para el receptor NK3 (Maggi 2000; Regoli, Boudon, Fauchere 1994). Cabe resaltar, que los NP $\gamma$  y NPK se unen preferentemente al receptor NK2 pero también presentan una alta afinidad por el NK1 (Burcher et al. 1991b; Prat, Picard, Couture 1994; van Giersbergen et al. 1992). Además, estudios farmacológicos han revelado que la HK1 de ratón, rata y humano, así como la EKA y la EKB, producen efectos similares a los inducidos por la SP, actuando preferentemente a través del receptor NK1, aunque también son agonistas de los

receptores NK2 y NK3 (Bellucci et al. 2002; Camarda et al. 2002; Kurtz et al. 2002; Morteau et al. 2001; Page et al. 2003).

Tabla II. Afinidad de las Taquiquininas por los receptores (Lazarczyk, Matyja, Lipkowski 2007)

Receptor de Taquiquininas	Afinidad	Gen
NK1 (neuroquinina-1)	SP>NKA>NKB	TACR1
NK2 (neuroquinina-2)	NKA>NKB>SP	TACR2
NK3 (neuroquinina-3)	NKB>NKA>SP	TACR3

## 5. El receptor NK1 (NK1R)

Como hemos dicho anteriormente el NK1R se encuentra ampliamente distribuido tanto en el SNC como en el SNP (Quartara and Maggi 1998). En el SNC, el receptor NK1 ha sido implicado en diferentes respuestas comportamentales y en la regulación de la supervivencia y degeneración neuronal. A nivel de la médula espinal, el receptor NK1 se activa durante la transmisión sináptica, especialmente en respuesta a estímulos nociceptivos aplicados en el campo receptivo de las neuronas aferentes primarias, apoyando un papel importante del NK1R en la transmisión del dolor. Además, a nivel espinal el NK1R modula el reflejo autónomo, incluido el reflejo de micción. En el SNP, el receptor NK1 regula la función respiratoria y cardiovascular y está envuelto en la activación del reflejo emético. El NK1R está ampliamente expresado en el sistema respiratorio, genitourinario y gastrointestinal, además de en numerosas células inmunes e inflamatorias. En el sistema cardiovascular, el NK1R media la vasodilatación a través del endotelio y la extravasación plasmática. A nivel respiratorio, estos receptores median la inflamación neurogénica. En el cuerpo carotideo el receptor NK1 media la respuesta ventilatoria a la hipoxia. En el sistema gastrointestinal, media la contracción del músculo liso, regula el agua y la secreción iónica y la comunicación interneuronal. En el sistema genitourinario, NK1R está ampliamente distribuido en la pelvis renal, uréter, vejiga urinaria y uretra y media la contracción del músculo liso y la inflamación en respuesta a estímulos nocivos.

El mecanismo de acción del receptor NK1 está mediado por la activación de la proteína G. Uno de los bucles intracelulares del NK1R está unido a la proteína G que es un heterotrímero,



formado por tres subunidades distintas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . En reposo la subunidad  $\alpha$  está unida a GDP y la  $\beta$  se asocia a la subunidad  $\gamma$ . Cuando la SP u otro ligando se une al receptor NK1 se produce la activación de la proteína G y se produce la disociación de sus subunidades:  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  que conlleva la activación de sistemas de señalización de segundos mensajeros dando lugar en última instancia a la elevación de la concentración de  $IP_3$  y calcio intracelular (Quartara and Maggi 1997).

Se ha demostrado que el NK1R, al igual que otros GPCRs, tras la unión con el ligando adecuado puede sufrir endocitosis. La exposición prolongada a ligandos endógenos producen desensibilización del receptor, translocación a los endosomas y degradación (Jenkinson et al. 1999; Tsao, Cao, von Zastrow 2001). Por lo tanto, la exposición crónica a SP puede inducir la degradación y regulación a la baja del receptor NK1 (Cottrell et al. 2006).





CAPÍTULO I. LA SENSIBILIZACIÓN MOTORA COMO  
FACTOR DE VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN:  
MODULACIÓN POR SP

Miguel  
Hernández



## LOCOMOTOR SENSITIZATION AS A FACTOR OF VULNERABILITY IN ADDICTION: THE ROLE OF SUBSTANCE P

### Abstract

Sensitization, as the upregulation of certain neuronal parameters, has been proposed as a required condition for both the onset and the progression of addictive behaviour. The preferred receptor of substance P, the NK1 receptor, is expressed in brain areas such as the nucleus accumbens that mediate the motivating properties of natural rewards and drug abuse. Thus, as neural sensitization underlies addictive behavior, we decided to study one of its markers. More specifically, we evaluated motor sensitization as a vulnerability factor in addiction by studying in mice both individual differences to sensitization as well as the possible role of substance P. Individual differences in motor sensitization after drug treatment were correlated with the susceptibility of developing an addicted-like behaviour (drug-seeking and motivation), and with the expression of genes linked to addiction and neural plasticity. Mutant NK1<sup>-/-</sup> mice showed a reduced, morphine-induced locomotor sensitization, and in fact a higher percentage of NK1<sup>-/-</sup> mice resistant to morphine sensitization was found. The motivational properties of morphine were lower in drug-sensitized NK1<sup>-/-</sup> mice when compared to the drug-sensitized NK1<sup>+/+</sup> mice despite no correlation between locomotor sensitization vulnerability induced by morphine and the persistence of compulsive drug-seeking behavior being found. Sensitization, due to repeated morphine exposure, induced the overexpression of the  $\Delta Fosb$ , *Bdnf*, and *CamkII* genes in some areas of the brain that are involved in the mesolimbic pathway. Furthermore, the gene expression levels of *CamkII* (nucleus accumbens or NAc), *Nurr1* and *Bdnf* (striatum), and *Glur2* (prefrontal cortex or PFC) differed between genotypes. A correlation between the susceptibility of developing a morphine-induced locomotor sensitization and the expression levels of *CamkII*, *Nurr1* and *Bdnf* in the NAc was also found. These results suggest that vulnerability to morphine sensitization increases molecular changes in certain brain circuits that underlie the processes of addiction and synaptic plasticity. However, we have not yet been able to directly correlate these molecular alterations with the characteristic behaviors of drug addicts themselves.

## Conclusions

1. In NK1<sup>-/-</sup> mice, the acquisition and manifestation of locomotor sensitization induced by morphine are both statistically reduced, whereas in the case of cocaine induction they remain unaltered. Moreover, upon classifying the mice into either drug sensitized (S) or non-sensitized (NS) groups, we find a similar percentage of each genotype in both groups for cocaine, while a higher percentage of NK1<sup>-/-</sup> mice resistant to sensitization for morphine.
2. Acquisition and maintenance of operant food self-administration, and motivation for natural rewards both remain unaltered in the NK1<sup>-/-</sup> mice. No correlation between locomotor sensitization vulnerability induced by morphine and motivation induced by a natural reinforcer was found.
3. NK1<sup>-/-</sup> mice are able to acquire and maintain operant morphine self-administration. Morphine sensitized NK1<sup>-/-</sup> mice are significantly less motivated by the drug than the sensitized NK1<sup>+/+</sup> mice. In addition, locomotor sensitization vulnerability induced by morphine does not increase the persistence of compulsive drug-seeking behavior, and thus does not represent a vulnerability factor for the development of this characteristic addiction behavior.
4. Morphine induces overexpression of genes involved in addiction and neuroplasticity within the NAc ( $\Delta Fosb$ , *Bdnf*, *CamkII* and *Glur2*), striatum ( $\Delta Fosb$ ), and PFC (*Glur2*). Also the expression levels of some of these genes (*CamkII* in the NAc, *Nurr1* and *Bdnf* in the striatum, and *Glur2* in the PFC) differ between genotypes. On the other hand, there is a correlation between the propensity of locomotor sensitization induced by morphine and the expression levels of *CamkII*, *Nurr1* and *Bdnf* in the NAc. Therefore we can conclude that the molecular changes underlying the processes of addiction and synaptic plasticity are higher in those mice that are sensitized to morphine.



**INTRODUCCIÓN**





## 1. Proceso de adicción

En la actualidad, el consumo de drogas supone un problema para nuestra sociedad: se producen 187.100 muertes al año relacionadas con el consumo de drogas, favorece la propagación de enfermedades como el VIH y debilita el desarrollo socioeconómico. Según el Informe Mundial sobre Drogas de las Naciones Unidas para el año 2015 (UNODC, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito), se calcula que unos 246 millones de personas de entre 15 y 64 años (o el 5% de la población adulta del mundo) consumieron por lo menos una vez en 2013 alguna droga ilícita (Tabla I).

**Tabla I. Prevalencia anual y número de consumidores de drogas ilícitas a nivel mundial, UNODC 2012**

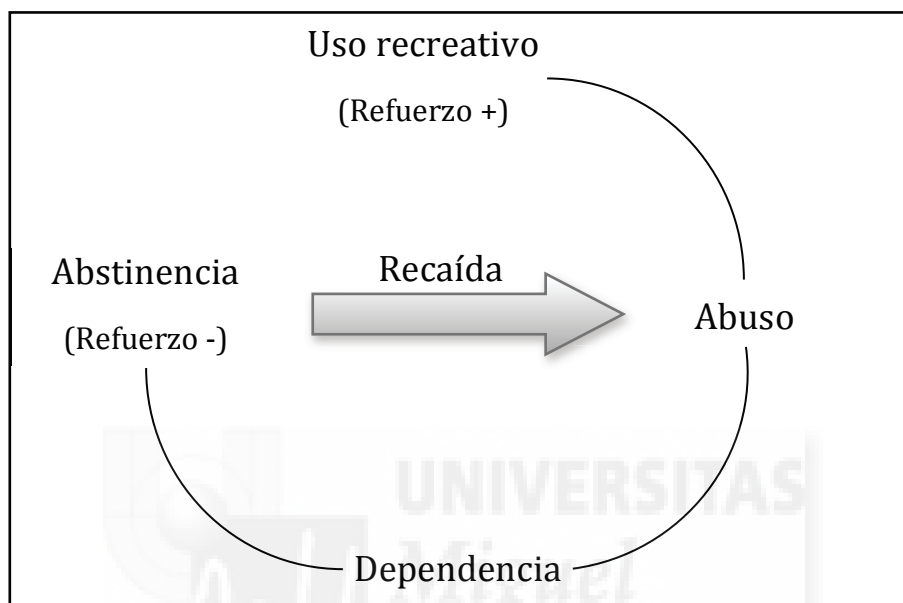
	Prevalencia (%)	Número (millones de consumidores)
Cannabis	3,8	171.63
Opioides	0,7	33.04
Opiáceos	0,35	16.37
Cocaína	0,37	17.24
Estimulantes tipo anfetamínico	0,7	34.4
“Éxtasis”	0,4	18.75

Muchas personas consumen o han consumido alguna droga ilícita al menos una vez en su vida y sin embargo, a pesar del gran potencial adictivo de algunas drogas no todas las personas se vuelven dependientes (O'Brien and Anthony 2005). Por este motivo, es muy importante distinguir entre los diferentes patrones de consumo de drogas: uso, abuso y adicción o dependencia. El uso de drogas hace referencia al consumo ocasional o recreativo, el abuso alude a un consumo recurrente y perjudicial y la adicción es una enfermedad crónica y recidivante. Además, la adicción está caracterizada por: la búsqueda y el consumo compulsivo de la droga, la pérdida de control para limitar el consumo a pesar de las consecuencias negativas para el sujeto y la aparición de estados emocionales negativos (disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando no se tiene acceso a la droga (Koob and Le Moal 1997).

El proceso de adicción empieza con un consumo ocasional y controlado de la droga que produce un refuerzo agudo positivo. En ocasiones este consumo se transforma en compulsivo,

iniciándose el proceso de dependencia. Cuando el acceso a la droga está impedido se produce la abstinencia, que actúa como refuerzo negativo, conduciendo a una recaída en el consumo y la consecuente entrada en el ciclo de la adicción (Figura 1).

Figura 1. Proceso de adicción



(Koob and Le Moal 2005)

## 2. Sustrato neurobiológico de la adicción

### 2.1. Circuito neuronal de recompensa

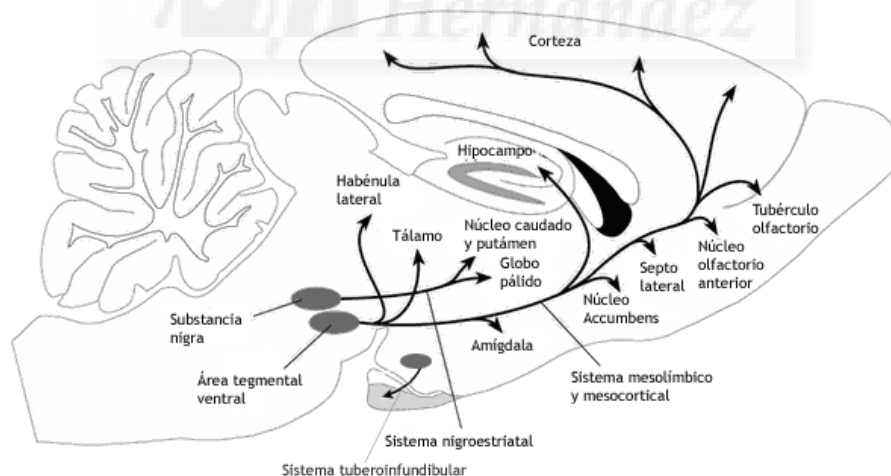
Los trabajos pioneros de Olds (OLDS and MILNER 1954), realizados mediante técnicas de autoestimulación intracraneal en ratas, revelaron que la autoadministración de breves estímulos eléctricos en determinadas áreas cerebrales producía un efecto placentero en los animales, lo que hacía que esta conducta se volviera persistente. En estos experimentos se evidenció la existencia de núcleos cerebrales implicados en la recompensa, cobrando especial importancia la vía mesocorticolímbica dopaminérgica.

Además, Wise y Bozarth (Wise and Bozarth 1987) postularon la teoría psicoestimulante de la adicción la cual respalda que tanto las drogas de abuso como los recompensantes naturales estimulan los circuitos neuronales implicados en la recompensa. Estos reforzadores positivos

incrementan la actividad del sistema mesolímbico dopaminérgico para producir sus efectos recompensantes (Di Chiara and Imperato 1988).

El sistema mesolímbico dopaminérgico está formado por tres vías (Figura 2):

1. La vía dopaminérgica nigroestriatal que se origina en la sustancia negra (SN) y proyecta al cuerpo estriado (Koob and Le Moal 2001). Esta vía regula la actividad motora y coordina los diferentes grupos musculares en los programas motores.
2. La vía dopaminérgica mesocorticolímbica, constituida por proyecciones que van desde el área tegmental ventral (ATV) al núcleo accumbens (NAC), hipocampo, tubérculo olfatorio, amígdala y corteza prefrontal (CPF). El NAC envía proyecciones eferentes hacia el pálido ventral y el ATV, formando así un bucle de control recíproco. Esta vía desempeña un papel crítico en los efectos recompensantes de las drogas de abuso, constituyendo el principal sistema de refuerzo común a todas ellas (Koob and Le Moal 1997; Koob, Sanna, Bloom 1998; Robbins and Everitt 1999).
3. La vía tuberoinfundibular presenta proyecciones desde el hipotálamo al infundíbulo y a la hipófisis anterior y regula la liberación de prolactina.



(Soria et al. 2006)

**Figura 2. Diagrama de las principales vías del sistema mesolímbico dopaminérgico en un corte sagital de cerebro de rata: vía nigroestriatal, vía mesocorticolímbica y vía tuberoinfundibular.**

## 2.2. Receptores dopaminérgicos

La dopamina (DA) interacciona con receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de GPCRs (metabotrópicos), cuya activación conduce a la formación de segundos mensajeros, y a la activación o represión de vías de señalización específicas. Existen 5 tipos de receptores dopaminérgicos que en base a sus propiedades estructurales y farmacológicas se subdividen en 2 tipos: tipo 1, los cuales estimulan los niveles intracelulares de AMPc e incluyen los receptores D1 y D5, y tipo 2, los cuales inhiben los niveles intracelulares de AMPc (Jackson and Westlind-Danielsson 1994; Missale et al. 1998) e incluyen a los receptores D2, D3 y D4.

Los receptores D1 y D2 son los más expresados en el cerebro de roedor, mientras que la expresión de los receptores D3, D4, y D5 está más restringida. El receptor D1 es muy abundante en la amígdala (Meador-Woodruff 1994; Weiner et al. 1991). El receptor D3 se localiza principalmente en NAc e Islas de Calleja (Diaz et al. 2000). El receptor D4 se localiza exclusivamente en estructuras límbicas: NAc, hipocampo, amígdala y CPF (Svingos, Periasamy, Pickel 2000), mientras que el receptor D5 se localiza en el hipocampo, el hipotálamo y algunos núcleos talámicos, siendo muy escasa su presencia en estriado y neocórtex (Khan et al. 2000).

Los receptores D2 son receptores presinápticos localizados en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (ATV y SN) (Sesack, Aoki, Pickel 1994) cuya función principal es la inhibición y modulación de la neurotransmisión dopaminérgica. Específicamente, los receptores D2 se encuentran altamente expresados en las neuronas estriatopalidales gabaérgicas espinosas de tamaño mediano (Gerfen and Engber 1992). Además, el receptor D2 presenta dos isoformas generadas por procesamiento alternativo del mismo gen (Dal Toso et al. 1989; Montmayeur et al. 1991), D2S y D2L, con propiedades fisiológicas y localizaciones distintas, lo cual podría estar relacionado con las diferencias individuales en la vulnerabilidad a la adicción (Moyer et al. 2011).

Existen numerosos estudios que apoyan la implicación de los receptores D2 en diferentes procesos que subyacen a la adicción a drogas de abuso (Goldstein and Volkow 2002): propiedades placenteras inducidas por cocaína, morfina y etanol (Matsuzawa et al. 1999; Nazarian et al. 2004; Rezayof et al. 2002), búsqueda compulsiva de cocaína y heroína (De Vries et al. 2002) y recaída inducida por reexposición a la droga, por presentación de estímulo

condicionado o por estrés (Gal and Gyertyan 2006; McFarland et al. 2004; Schenk and Gittings 2003).

### **2.3. Modulación del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico**

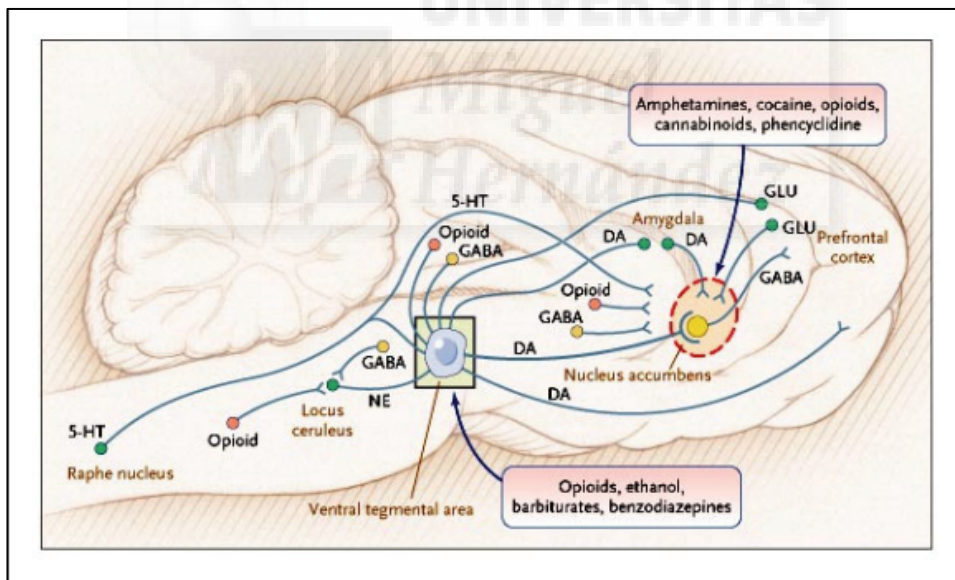
El sistema dopaminérgico ha sido el más estudiado en los fenómenos adictivos. Sin embargo, existen numerosos estudios que han revelado la importancia de otros sistemas en los procesos de placer y refuerzo, como los sistemas glutamatérgico, gabaérgico, colinérgico, serotoninérgico y opioide (Koob and Le Moal 2005), ya que modulan el sistema de recompensa. Por otra parte, el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) implicado en la respuesta al estrés, media el incremento del factor de liberación de corticotropina (CRF) en áreas límbicas durante los periodos de abstinencia (Cummings et al. 1983; Heinrichs et al. 1995), lo que parece estar relacionado con el estrés y los efectos disfóricos que se producen durante estos periodos y durante la recaída. La desregulación progresiva del sistema dopaminérgico está asociado con la transición a la adicción, caracterizada por la búsqueda y el consumo compulsivo de drogas (Everitt and Robbins 2005; Nestler 2001a; Robinson and Berridge 1993).

Las drogas de abuso, a través de diferentes mecanismos, consiguen incrementar y prolongar los niveles extracelulares de dopamina en regiones límbicas, en especial en el NAc (Di Chiara 2002; Koob and Bloom 1988). En el caso de los psicoestimulantes como la cocaína, la amfetamina, la metanfetamina o el éxtasis se produce un aumento de los niveles de dopamina como consecuencia del aumento de la liberación de DA y del bloqueo de los transportadores de dopamina presinápticos, lo que impide su recaptación aumentando los niveles de este neurotransmisor en la hendidura sináptica (Madrás et al. 1994). Otras drogas como la nicotina, el alcohol, los opiáceos y el  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol (THC), actúan indirectamente modificando la actividad de neuronas gabaérgicas o glutamatérgicas que al mismo tiempo modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 3).

La activación del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico está implicado en los procesos reforzantes tanto de las drogas de abuso como de los recompensantes naturales como comida, agua, sexo o situaciones novedosas, aunque los sustratos neuronales difieren entre ambos tipos de refuerzo (Carelli and Ijames 2001; Carelli and Wondolowski 2006). Las proyecciones dopaminérgicas que se originan en el ATV proyectan a estructuras límbicas

como el NAc, la amígdala y el hipocampo. En el núcleo accumbens se localiza en la parte ventral del complejo estriatal y está formado por dos zonas diferenciadas: core o núcleo “sistema motor” y shell o corteza “sistema límbico”. Este núcleo desempeña un papel clave, actuando como una interfase neural entre el sistema límbico y el motor donde la motivación se traduce en acción (Mogenson, Jones, Yim 1980); dicho de otro modo, transfiere la información motivacional importante para que se codifiquen los actos motores adecuados. El NAc se compone de dos tipos principales de neuronas (Gangarossa et al. 2013):

- neuronas espinosas de mediano tamaño (constituyen el 95% de las neuronas estriatales), son células inhibitorias de proyección GABAérgicas que proyectan hacia el pálido ventral (PV), ATV/SN y CPF. Además de sus axones de proyección estas neuronas también tienen numerosas colaterales locales.
- interneuronas colinérgicas de circuito local (constituyen el 5% de la población total de neuronas).



(Cami and Farre 2003)

**Figura 3. Circuitos de recompensa neural implicados en los efectos reforzantes de las drogas de abuso en un plano sagital de cerebro de rata (Cami and Farre 2003).** El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico cuyo origen se localiza en el ATV incluye proyecciones desde los cuerpos neuronales de las neuronas dopaminérgicas situadas en el ATV hacia el NAc, amígdala y CPF; proyecciones glutamatérgicas (GLU) desde la CPF al NAc y al

ATV; y la proyección de neuronas gabaérgicas (GABA) desde el NAc hasta la CPF. Las interneuronas de tipo opioide modulan la acción inhibitoria de las neuronas gabaérgicas en el ATV e influyen en la activación de neuronas noradrenérgicas (NE) del Locus coeruleus. Las proyecciones serotoninérgicas (5-HT) van desde el Núcleo del Rafe hasta el ATV y el NAc. En la imagen se muestran los sitios de acción propuestos para diferentes drogas de abuso dentro de estos circuitos.

Como hemos dicho anteriormente, el sistema dopaminérgico mesolímbico cortical envía proyecciones desde los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el ATV hasta el NAc, amígdala y CPF. Estas neuronas dopaminérgicas realizan sinapsis con las neuronas espinosas medianas de tipo gabaérgico del NAc (Gardner 2002; Wise and Bozarth 1984; Wise and Bozarth 1985). Además, la actividad dopaminérgica de este circuito mesolímbico cortical está modulada por otros sistemas de neurotransmisión, a través de proyecciones de distintos tipos con otras áreas cerebrales (ver Fig.3). De hecho, la corteza prefrontal medial (mCPF) envía proyecciones glutamatérgicas al NAc y al ATV. El NAc envía proyecciones de naturaleza gabaérgica al pálido ventral, al ATV/SN y al CPF. A su vez, el pálido ventral y el ATV envían eferentes gabaérgicas al tálamo dorsomedial. El circuito se cierra gracias a proyecciones glutamatérgicas desde el tálamo dorsomedial a la mCPF (Pierce and Kumaresan 2006).

### 3. Teorías de la adicción

Las teorías de la adicción se pueden agrupar en dos familias en función del marco teórico elegido para explicar la transición a la adicción: centrado en la droga o centrado en el individuo.

La primera familia de teorías sostiene que la transición a la adicción se produce únicamente como consecuencia del uso prolongado de la droga y de los cambios neurobiológicos inducidos por el uso crónico de la misma. Dentro de esta familia se incluyen teorías enfocadas en los cambios específicos debidos al uso de la droga como: tolerancia (Roberts et al. 2002), sensibilización (Robinson and Berridge 1993; Robinson and Berridge 2000; Robinson and Berridge 2008; Wise and Bozarth 1987), abstinencia y alostasis (Koob and Le Moal 2005; Koob and Le Moal 2008; Koob 2008) o cambios cognitivos inducidos por la droga en la impulsividad (Jentsch and Taylor 1999), la toma de decisiones (Bechara 2001), y el condicionamiento (Robbins, Everitt, Nutt 2008). Estas teorías se han visto reforzadas por las numerosas

evidencias existentes acerca de las neuroadaptaciones a nivel molecular, celular (Nestler, Hope, Widnell 1993; Nestler 1994), sináptico (Hyman, Malenka, Nestler 2006), y estructural (Everitt and Wolf 2002; Wolf 2010) inducidas por el consumo crónico de droga en los circuitos neuronales implicados en recompensa, aprendizaje y motivación incentivante.

La segunda familia de teorías sostiene que la transición a la adicción se produce únicamente en un reducido número de consumidores de drogas los cuales presentan una vulnerabilidad al desarrollo de la adicción. En este marco teórico la droga es un factor necesario pero no es suficiente para que se produzca dicha transición. Las diferencias entre las teorías incluidas dentro de este grupo radica en el grado de importancia atribuido a los factores implicados en el desarrollo de esta vulnerabilidad individual: factores genéticos (Crabbe et al. 1999; Crabbe 2002; Ellenbroek et al. 2005; Uhl 2004a), ambientales (Goeders 2002; Piazza and Le Moal 1996), interacción entre ambos (Cabib et al. 2000; van der Kam, Ellenbroek, Cools 2005) y fenómenos que acontecen durante etapas tempranas (Barron et al. 2005; Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, Spear 2010; Koehl et al. 2002).

### **Vulnerabilidad a la adicción**

La progresión desde el uso inicial de las drogas hasta el desarrollo de la adicción está influenciada por diferentes factores:

- ✓ Neurobiológicos: La propia droga y los cambios neurobiológicos a largo plazo que produce su consumo. El uso prolongado de una droga induce cambios en la función cerebral que subyacen a la adicción y, que se manifiestan en la actividad metabólica, disponibilidad de receptores, expresión de genes y respuesta a señales ambientales.
- ✓ Genéticos (Uhl 2004a): a los que se les atribuye entre el 30 y el 60% del desarrollo de la adicción. Además, se sabe que algunos rasgos de personalidad del individuo con bases genéticas como la impulsividad, la búsqueda de novedad (Benjamin et al. 1996; Ebstein, Benjamin, Belmaker 2000) y el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (LaHoste et al. 1996) pueden contribuir especialmente en el inicio del consumo de la droga.
- ✓ Factores Ambientales: actuando fenómenos como el estrés o la exposición temprana



a las drogas como factores de vulnerabilidad a la adicción.

La interacción entre estos factores determina la mayor vulnerabilidad de algunos individuos para desarrollar adicción.

### **3.1. Teoría “general” de la transición a la adicción (Piazza and Deroche-Gamonet 2013)**

La controvertida teoría general de la transición a la adicción surge con la intención de organizar y sintetizar el conocimiento generado en los últimos años en el campo de la adicción por distintos investigadores (Piazza and Deroche-Gamonet 2013). El principio general de esta teoría es que la transición a la adicción se debe a la interacción entre la vulnerabilidad individual, el grado de exposición a la droga y la pérdida de control sobre el consumo. Además, el principal propósito de esta teoría es apoyar la idea de que la adicción es verdaderamente una patología psiquiátrica.

Esta teoría sostiene que la transición a la adicción se debe a la progresión a través de tres fases consecutivas e independientes; entrar en una fase es necesario pero no suficiente para progresar a la siguiente ya que para ello también se requieren vulnerabilidades individuales específicas:

- 1) Uso recreativo y esporádico de la droga. En esta fase el consumo de la droga es esporádico y con fines recreativos, en la cual se produce un proceso de aprendizaje donde la sobreactivación de los sustratos neurobiológicos de los recompensantes naturales permite que muchos individuos perciban las drogas como estímulos altamente gratificantes.
- 2) Uso de la droga intensificado, sostenido y escalado. En esta fase el consumo de la droga se intensifica, siendo sostenido y frecuente y, volviéndose la principal actividad recreativa para el individuo. Esta fase se da en algunos individuos vulnerables que presentan sensibilización del sistema dopaminérgico e hipofunción de la corteza prefrontal. Este uso sostenido y prolongado de la droga induce sensibilización incentivante y un estado alostático que hace que la droga se desee y se necesite de

forma intensa. Además, la formación de hábitos también contribuye a la estabilización de esta fase.

- 3) Pérdida de control en el uso de la droga y adicción completa. Esta fase se da en individuos vulnerables en los que el uso prolongado de la droga produce una pérdida de plasticidad sináptica a largo plazo en áreas recompensantes del cerebro, induciendo así la pérdida de control en el consumo. Esta pérdida de control y la entrada en la completa adicción desencadena un comportamiento aberrante del adicto, ya que las actividades relacionadas con la droga se transforman en las principales para el individuo. En esta fase en la que la transición a la adicción se ha completado, la ausencia de droga produce en los individuos adictos una especie de “luto patológico” debido a la pérdida irremplazable de la droga.

### **3.2. Teoría de la sensibilización incentivante (Robinson and Berridge 1993)**

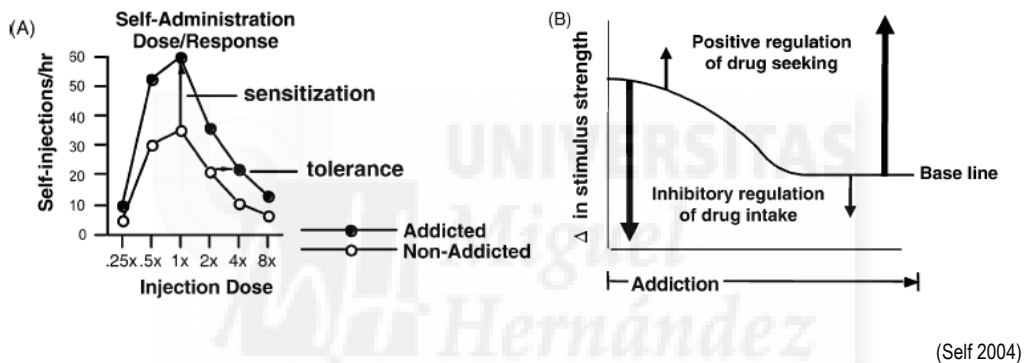
Esta teoría sugiere que la exposición repetida a drogas induce sensibilización de los sistemas cerebrales mesocorticolímbicos tanto a los efectos directos de la droga como a los estímulos asociados con la misma.

La teoría de la sensibilización incentivante diferencia entre el valor incentivo de la droga (“wanting”) y el efecto placentero o hedónico que produce (“liking”). A medida que se desarrolla la adicción se produce sensibilización o regulación positiva de la motivación por la droga y tolerancia a los efectos placenteros subjetivos producidos por la misma (Figura 4). Esta sensibilización se manifiesta en humanos adictos por un incremento del deseo por la droga tan elevado que se vuelve patológico (“craving”) y un aumento de la dosis consumida pero una reducción de la euforia que cada dosis les produce comparado con cuando iniciaron el consumo. Esta hipersensibilización conlleva a la búsqueda y consumo compulsivo de las drogas independientemente del placer que producen, del síndrome de abstinencia en su ausencia, y de los hábitos o memorias formados anteriormente (Berridge and Robinson 1998; Robinson and Berridge 1993; Robinson and Berridge 2000).

Además del incentivo motivacional por la droga (“wanting”), el otro tipo de efecto que sensibiliza con el consumo de drogas es la activación psicomotora. Esto se debe a que los

sustratos neuronales que median los efectos psicomotores de las drogas, concretamente el sistema mesolímbico dopaminérgico, coinciden con los sustratos responsables de las propiedades reforzantes de las drogas de abuso (Wise and Bozarth 1987). En animales de experimentación, el “wanting” es un proceso psicológico muy complejo de estudiar por lo que se evalúa la sensibilización psicomotora como marcador de la sensibilización neural. Éste parámetro se evalúa fácilmente, registrando el incremento progresivo de los efectos locomotores (locomoción y esterotipias) inducidos por la droga.

Una de las consecuencias más importantes derivadas del proceso de sensibilización cerebral es que incrementa la vulnerabilidad a las recaídas en adictos recuperados.



**Figura 4. A) Curva dosis respuesta de autoadministración de droga en animales adictos y no adictos. B) Cambios en los mecanismos que regulan la búsqueda y el consumo de la droga durante el desarrollo de la adicción.** A medida que se progresa en el proceso de adicción los individuos adictos desarrollan sensibilización en la búsqueda de droga o “drug seeking” que se manifiesta por un desplazamiento vertical en la curva dosis respuesta como un índice del incremento en el esfuerzo por mantener los niveles cerebrales de droga y, simultáneamente los individuos adictos desarrollan tolerancia en el consumo de droga o “drug intake”, reflejada por el desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis respuesta lo cual evidencia el incremento en el consumo de la droga.

#### 4. Sensibilización inducida por drogas

La exposición repetida a un estímulo determinado induce un incremento en la respuesta frente a dicho estímulo, esto se conoce con el término de sensibilización (Kalivas and Stewart 1991). De este modo la exposición repetida a drogas de abuso produce un aumento en la activación de la respuesta motora o “sensibilización psicomotora” (Robinson and Berridge 1993;

Vanderschuren et al. 2001) La sensibilización motora se caracteriza por su persistencia; tanto en animales (Castner and Goldman-Rakic 1999; Paulson, Camp, Robinson 1991) como en humanos (Strakowski et al. 1996), se ha demostrado que la sensibilización puede perdurar meses e incluso hasta un año después del cese del tratamiento con la droga. La sensibilización motora es inducida por muchas drogas de abuso como anfetamina, cocaína, morfina, alcohol, nicotina y  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol (THC), especialmente si son administradas de forma intermitente (Cadoni et al. 2001; Cunningham and Noble 1992; Joyce and Iversen 1979; Post et al. 1992; Robinson and Becker 1986). Además, se ha descrito un fenómeno de cross-sensibilización entre drogas, lo que sugiere un mecanismo común que subyace al desarrollo de la sensibilización psicomotora. Un ejemplo de esta cross-sensibilización es que animales tratados repetidamente con etanol son capaces de sensibilizar a cocaína y viceversa (Itzhak and Martin 1999).

El desarrollo de la sensibilización motora comprende dos fases: iniciación y expresión. La fase de iniciación engloba los sucesos neurales iniciales que inducen la sensibilización psicomotora, mientras que la de expresión incluye las consecuencias a largo plazo derivadas de estos eventos iniciales (Kalivas and Stewart 1991). Un factor que puede influir en ambas fases de la sensibilización es el ambiente; animales tratados de forma repetida con cocaína, anfetamina y morfina durante la fase de iniciación muestran una sensibilización más robusta si la re-exposición con la droga durante la fase de expresión se realiza en el mismo ambiente utilizado en la fase de iniciación (sensibilización dependiente de contexto) (Anagnostaras and Robinson 1996; Vezina et al. 1989; Vezina and Leyton 2009).

Existen diferentes factores que pueden influir en la magnitud con la que se desarrolla la sensibilización motora como el tipo de tratamiento, el intervalo entre ellos y la dosis empleada. Además, existen diferencias individuales que influyen en la susceptibilidad a sensibilizar y que vienen determinadas por varios factores, entre otros las hormonas sexuales, las hormonas de estrés (existe cross-sensibilización entre estrés y drogas) (Piazza et al. 1991; Shaham, Erb, Stewart 2000), las experiencias traumáticas previas, las enfermedades psiquiátricas y por supuesto las posibles variaciones genéticas interindividuales.

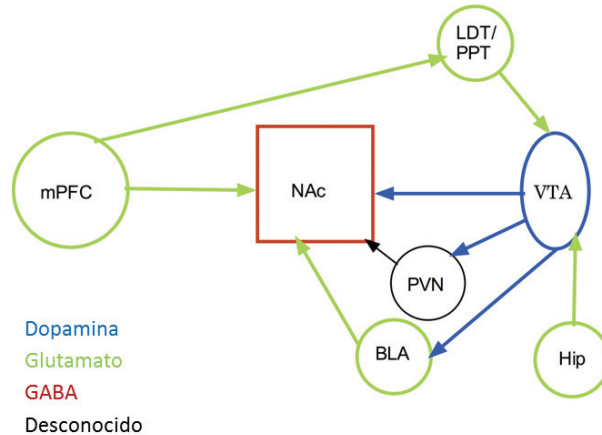
En cuanto al circuito neuronal implicado en la sensibilización, está extensamente aceptado que las drogas de abuso usurpan los circuitos neuronales implicados en los efectos reforzantes

tanto de las drogas como de los recompensantes naturales, los cuales se solapan con los sustratos neuronales que median los efectos psicomotores de las drogas (Wise and Bozarth 1987).

La fase de iniciación de la sensibilización motora está generalmente asociada con el área tegmental ventral (ATV), mientras que la de expresión está relacionada con el núcleo accumbens (NAc) (Kalivas and Stewart 1991). Además, estudios en los cuales se han inducido lesiones en la corteza prefrontal medial (CPFm) han implicado también a esta región en el desarrollo de la sensibilización (Wolf et al. 1995) (Figura 5).

A parte de las áreas que constituyen el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (ATV, NAc y CPFm), diferentes regiones cerebrales como el pálido ventral, el hipocampo, la amígdala, el tegmento laterodorsal (LDT) y el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), actuando a través del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, influyen en el desarrollo de la sensibilización (Cador et al. 1999; Degoulet et al. 2008; Mickiewicz, Dallimore, Napier 2009; Wolf et al. 1995).

El circuito neural implicado en la sensibilización incluye proyecciones dopaminérgicas desde el ATV que modulan el NAc, bien directamente o a través del PVN y la amígdala basolateral (BLA) (Kita and Kitai 1990; Oades and Halliday 1987; Shinonaga, Takada, Mizuno 1994; Takada et al. 1990). Además, el NAc recibe proyecciones glutamatérgicas directas desde la CPFm e indirectas vía LDT y ATV (Omelchenko and Sesack 2005; Omelchenko and Sesack 2007; Pierce and Kalivas 1997). También existen proyecciones de neuronas GABAérgicas desde el ATV hacia el NAc y la CPFm, mientras que los terminales dopaminérgicos localizados en el NAc además liberan glutamato (Tecuapetla et al. 2010; Van Bockstaele and Pickel 1995). Finalmente, el hipocampo (Hip) puede actuar en este circuito actuando mediante proyecciones glutamatérgicas directas sobre ATV (Lodge and Grace 2008) (Figura 4).



**Figura 5. Circuito neuronal implicado en el proceso de sensibilización (Steketee and Kalivas 2011).** Área tegmental ventral (ATV); núcleo accumbens (NAc); corteza prefrontal medial (mCPF); tegmento laterodorsal (LDT); núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN); amígdala basolateral (BLA); hipocampo (Hip).

## 5. Sensibilización motora como factor de vulnerabilidad a la adicción

Existen evidencias que asocian tanto los efectos reforzantes como los efectos psicomotores de las drogas de abuso con los mecanismos cerebrales que subyacen a la dependencia (Wise and Bozarth 1987), de forma que la activación psicomotora se considera como un reflejo de la sensibilización de los circuitos cerebrales implicados en el proceso adictivo. De esta manera la sensibilización, como expresión de la regulación al alza de algunos parámetros neuronales, ha sido propuesta como condición necesaria para el desarrollo y el establecimiento de la conducta adictiva (Robinson and Berridge 2000; Robinson and Kolb 2004). La sensibilización, por exposición repetida a una droga, altera la expresión de genes y con ello la función neuronal lo que se traduce en cambios funcionales de algunos circuitos cerebrales y en alteraciones de la conducta. La sensibilización psicomotora es una de las alteraciones más evidentes y además, es común a todas las drogas adictivas (Robinson and Berridge 1993; Robinson and Berridge 2000).

Los cambios responsables de la sensibilización se inician en la vía mesocorticolímbica dopaminérgica y afectan a la estructura y función de los ganglios basales y de la corteza prefrontal (Robinson and Kolb 2004; Uhl 2004a). Concretamente, la inducción de la

sensibilización motora a los psicoestimulantes ha sido asociada con un aumento de la densidad de las espinas dendríticas y con el desarrollo de múltiples cabezas en las dendritas apicales de las neuronas del core del NAc y de las zonas más mediales y ventrales de la corteza prefrontal (Robinson and Kolb 1997; Robinson and Kolb 1999a; Robinson and Kolb 1999b; Robinson and Kolb 2004). Estos cambios que se producen a nivel del NAc se han relacionado con el aumento del potencial incentivo de las señales condicionadas, lo cual aumentaría la probabilidad de un consumo abusivo y de las posteriores recaídas tras largos periodos de abstinencia (Robinson and Berridge 2003). Además, numerosos estudios relacionan la pérdida de control de la conducta adictiva y su resistencia a la extinción con una hipofunción frontal (Goldstein and Volkow 2002; Jentsch and Taylor 1999). De hecho, se sabe que la sensibilización inducida por psicoestimulantes tiene consecuencias notables en la función de la corteza prefrontal, ya que incrementa el tono basal y la respuesta de las neuronas dopaminérgicas del NAc (Hedou et al. 2001; Vezina 2004) y del ATV (Borgland, Malenka, Bonci 2004), al mismo tiempo que produce cambios opuestos en las vías dopaminérgicas de la corteza prefrontal medial, disminuyendo la función dopaminérgica prefrontal (Hedou et al. 2001). De acuerdo con estos resultados se ha observado que la lesión de la corteza prefrontal o la reducción de los niveles dopaminérgicos en esta zona promueve la sensibilización (Beyer and Steketee 1999; Bjjjou et al. 2002). Esta pérdida de control dopaminérgico frontal implica una reducción en la excitabilidad de las aferentes glutamatérgicas a los ganglios basales y por tanto, una alteración de las interacciones dopamina-glutamato en los circuitos frontoestriales (Beyer and Steketee 1999; Bjjjou et al. 2002; Hedou et al. 2001), lo que contribuye a la pérdida de control inhibitorio de la conducta.

Las alteraciones estructurales y funcionales previamente comentadas se deben a la inducción de dos familias de genes de expresión temprana (IEGs), CREB y  $\Delta$ FosB (forma truncada de FosB). La activación de la vía intracelular dependiente de AMPc y proteína quinasa A provoca la inducción del factor de transcripción temprano CREB en el NAc y la corteza prefrontal. Dicha inducción se ha relacionado principalmente con un mecanismo neuronal de regulación homeostática que provoca el desarrollo de tolerancia, la cual es transitoria y correlaciona negativamente con la sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas (Nestler 2004; Uhl 2004b). Por otra parte, la expresión temprana del factor de transcripción  $\Delta$ FosB inducida por la

administración aguda de droga es baja. Sin embargo, la administración crónica de droga produce su acumulación y sus niveles permanecen elevados durante muchas semanas después de la abstinencia en el NAc, estriado dorsal y corteza prefrontal medial (McClung and Nestler 2003; Nestler 2004). Se sabe que los animales que sobreexpresan  $\Delta$ FosB son más sensibles a los efectos estimulantes y recompensantes de la cocaína (McClung and Nestler 2003); son capaces de trabajar más y durante más tiempo para obtener esta droga (Nestler 2001a; Nestler 2001b); y presentan una mayor sensibilidad a la morfina (Nestler 2001a; Nestler 2001b). Se sabe que la sobreexpresión de  $\Delta$ FosB es un factor necesario para que se sensibilice la respuesta a los psicoestimulantes (Nestler 2001a; Nestler 2001b) y que su inducción por drogas es especialmente elevada en animales adolescentes (Pulvirenti and Diana 2001) cuyo cortex prefrontal no está aún totalmente mielinizado, siendo más sensibles a los efectos de las drogas. A su vez, existen genes de inducción tardía que ven alterada su transcripción como resultado de la inducción de  $\Delta$ FosB (Nestler 2004) y que son fundamentales en los procesos de plasticidad sináptica (CaM-kinasa II, gluR2, BDNF) (Robinson and Kolb 2004) y, en los cambios estructurales en las neuronas del núcleo accumbens y corteza prefrontal (Cdk5, MAP2) (McClung and Nestler 2003).

Además, existen otros genes de expresión temprana como  $\Delta$ c-Jun y Nurr1 (gen sobreexpresado tras tratamiento crónico con psicoestimulantes y durante la diferenciación embrionaria de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas) que han sido descritos como responsables de la sensibilización a las drogas (Nestler 2004).

## **6. Modelos animales de adicción a drogas de abuso**

Los avances alcanzados en el campo de la adicción se han llevado a cabo gracias al desarrollo de modelos animales de adicción a drogas los cuales nos han permitido estudiar los efectos recompensantes de las mismas, las bases neurobiológicas de la adicción y algunos de los componentes que conforman el proceso adictivo.

### **6.1. Condicionamiento espacial**

El condicionamiento espacial está basado en el condicionamiento clásico o pavloviano en el cual se produce un aprendizaje asociativo entre un determinado contexto y los efectos



reforzantes de una droga (Katz and Gormezano 1979). Este paradigma es comúnmente utilizado para evaluar los efectos recompensantes de las drogas de abuso, ya que es un modelo comportamental sencillo, rápido y económico.

El aparato generalmente utilizado consta de dos compartimentos o recintos visual y táctilmente distintos que pueden ser diferenciados por el animal. Este paradigma consta de tres fases: precondicionamiento, condicionamiento y test (Figura 6). En la fase de precondicionamiento el animal explora libremente ambos compartimentos. Durante el condicionamiento uno de los compartimentos se asocia a la droga y el otro al salino. Finalmente, el día del test el animal mostrará preferencia por aquel contexto en el que ha experimentado un refuerzo positivo (preferencia de plaza condicionada), siendo el tiempo de permanencia en este contexto un índice indirecto de los efectos reforzantes de la droga.

No obstante, este modelo presenta una clara limitación en el estudio del consumo de drogas, ya que el animal no se autoadministra la droga de forma voluntaria sino que la recibe pasivamente por el experimentador.



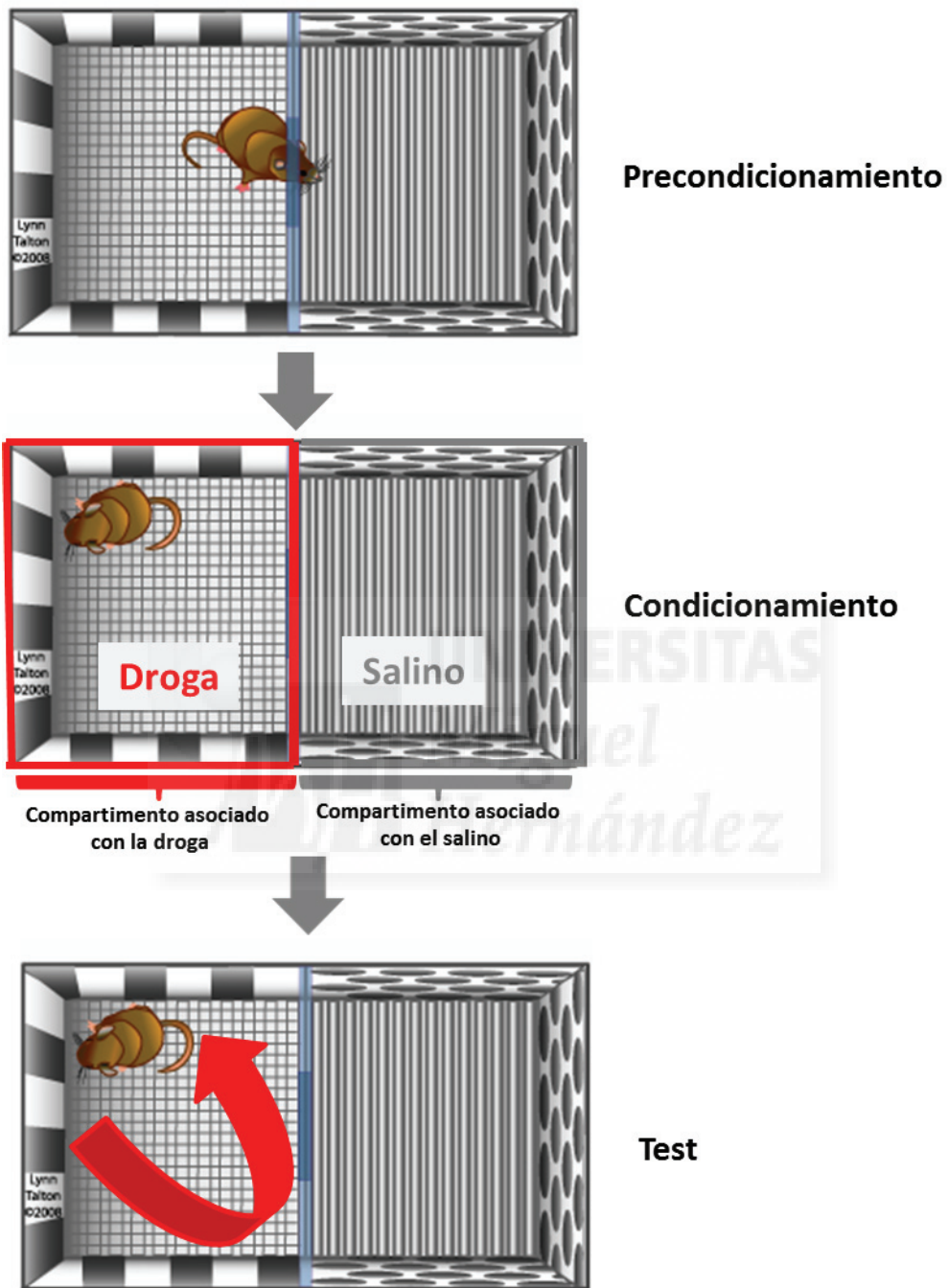
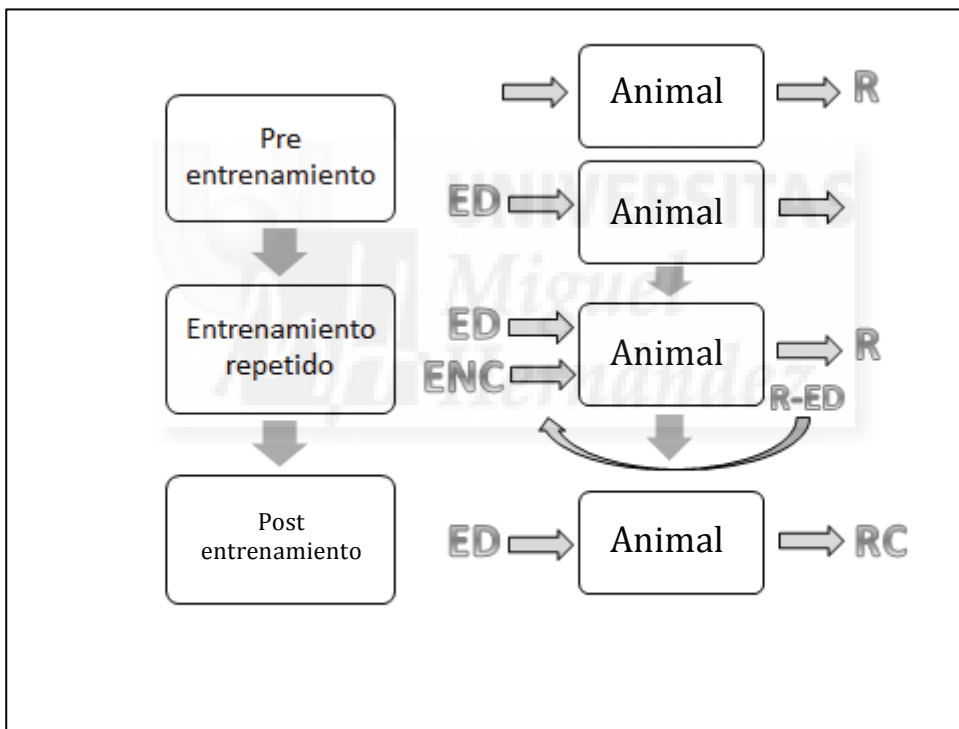


Figura 6. Esquema del ensayo de preferencia de plaza condicionada (CPP). Imágenes modificadas de (Lynn Talton 2006)

## 6.2. Condicionamiento operante o instrumental

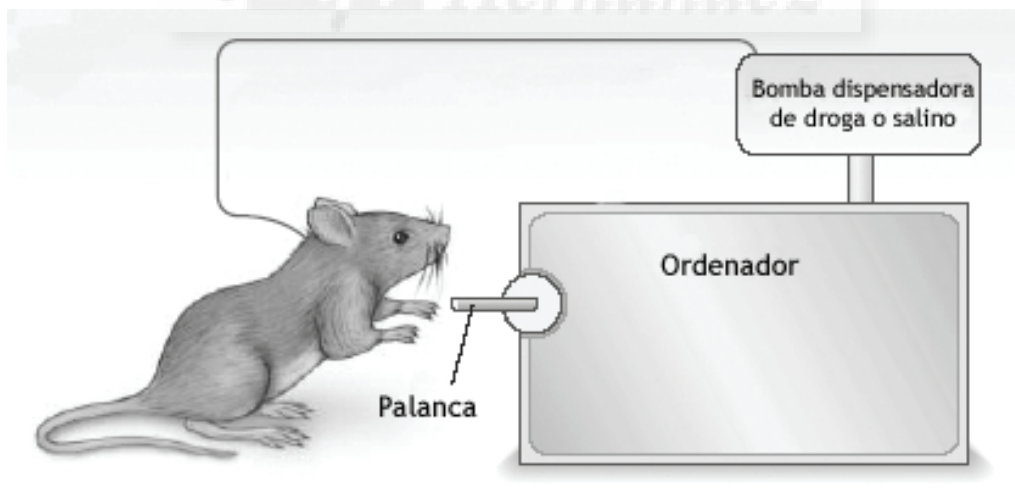
El condicionamiento operante o instrumental nace de la teoría psicológica del aprendizaje desarrollada por Skinner. En sus experimentos utilizó las denominadas cajas de Skinner, en las cuales ratas y palomas aprendían a apretar una palanca para obtener comida. Este paradigma se basa en el aprendizaje asociativo entre la respuesta que se le pide al animal y el refuerzo que recibe como consecuencia de la misma. De forma que, cuando una situación reforzante es contingente con una respuesta aumenta la probabilidad de que se repita dicha conducta (Figura 7).



**Figura 7. Esquema del protocolo experimental de condicionamiento operante.** En los experimentos de condicionamiento operante, se asocia un estímulo no condicionado (ENC, comida) con una determinada respuesta motora (R, apretar una palanca). En ocasiones, para indicar la disponibilidad del refuerzo se introduce un estímulo discriminativo (ED, luz). De forma que cuando el animal aprieta la palanca, se enciende la luz y se dispensa el refuerzo de forma contingente (R-ENC). Si el animal ha adquirido el comportamiento operante de apretar la palanca para obtener comida (R-ENC) mostrará una respuesta condicionada (RC, apretar una palanca); es decir, cuando se encienda la luz el animal apretará la palanca, incluso en ausencia de comida (ENC).

Los estudios de autoadministración se realizan en cajas de Skinner donde los animales, canulados en la yugular, aprenden a apretar una palanca (respuesta) para recibir una inyección intravenosa de la droga (refuerzo) (Figura 8). Entre las variables a tener en cuenta en el diseño de un protocolo de autoadministración se encuentran: la razón, el intervalo y el tiempo muerto o “time-out”. La razón es el número de respuestas que se le pide al animal para obtener el refuerzo y ésta puede ser: fija, progresiva, exponencial, aleatoria, etc. En los protocolos de razón fija (“fixed ratio” o FR), el número de respuestas que se le pide al animal para obtener el refuerzo es fijo. Por ejemplo, en un protocolo de razón fija 3 o FR3 el animal tiene que apretar la palanca 3 veces para recibir una inyección de droga. Por último, el “time-out” hace referencia al período de tiempo posterior a una infusión durante el cual el animal no tiene acceso a la droga.

Este modelo animal de autoadministración intravenosa se basa en el hecho de que tanto primates como roedores se autoadministran la mayoría de las drogas de abuso utilizadas por los humanos (Collins et al. 1984), lo cual nos permite predecir el potencial de abuso de las drogas y estudiar tanto la conducta de autoadministración como diferentes procesos implicados en la conducta adictiva como: la adquisición, el mantenimiento, la extinción y las recaídas.



**Figura 8. Modelo de condicionamiento operante de autoadministración intravenosa** (Cami and Farre 2003).

## **Adquisición**

Con la finalidad de estimar la actividad inespecífica del animal en los protocolos de autoadministración ha surgido una variación de la original “caja de Skinner” donde hay dos palancas, la respuesta en la palanca activa conduce a la infusión intravenosa de la droga, mientras que la respuesta en la palanca inactiva no presenta consecuencias. De forma que durante la fase de adquisición los animales experimentan por primera vez las propiedades reforzantes la droga y aprenden a discriminar entre la palanca activa e inactiva. Generalmente, para considerar que un animal ha adquirido la conducta de autoadministración debe cumplir unos criterios de adquisición basados en la estabilidad en la respuesta, la capacidad de discriminación entre palancas y un número mínimo de refuerzos por sesión.

La conducta de autoadministración, y particularmente la adquisición, puede estar influenciada por diferentes factores como las diferencias interindividuales donde se incluyen los factores genéticos (Piazza et al. 1989), la respuesta locomotora ante un ambiente novedoso (Piazza et al. 1990) y el estrés (Goeders 2002).

## **Mantenimiento**

Tras la adquisición, el animal ya conoce los efectos del refuerzo y la conducta que debe realizar para obtenerlo. Con la finalidad de eliminar el comportamiento inespecífico y consolidar la conducta, se va aumentando progresivamente el esfuerzo que debe realizar el animal para obtener el refuerzo incrementando el valor de la razón fija. El estudio del mantenimiento de la conducta de autoadministración de una droga nos permite evaluar la conducta adictiva del animal.

## **Motivación por la droga**

Para obtener información directa acerca de la motivación del animal por la droga se utilizan protocolos de razón progresiva. Estos protocolos consisten en aumentar progresivamente, en una misma sesión, el número de respuestas requeridas para obtener un refuerzo. El número máximo de respuestas que es capaz de realizar un animal para obtener una infusión de droga se denomina “Breaking Point” (BP o punto de corte) y refleja el trabajo que es capaz de realizar el animal para obtener un refuerzo, permitiéndonos cuantificar así el valor reforzante de la droga.

## **Extinción**

La fase de extinción se realiza en las mismas condiciones que la adquisición y el mantenimiento de la conducta de autoadministración pero en esta fase los animales no reciben droga sino vehículo. Como consecuencia de esto, se produce un cese progresivo de la conducta previamente asociada al consumo de droga. La resistencia a la extinción se puede utilizar como medida de las propiedades motivacionales de la droga aunque generalmente, la extinción se realiza como paso previo a la recaída.

## **Recaída**

La recaída o reinstauración en el consumo de droga tras el proceso de extinción es una prueba de que la adicción es un fenómeno crónico. Diferentes estudios, tanto en humanos como en animales, han demostrado que la recaída puede ser inducida por tres fenómenos: inyecciones no contingentes de droga ("priming") (Markou, Arroyo, Everitt 1999); estrés (Mantsch and Goeders 1999; Stewart 2000); y finalmente, la presentación de estímulos previamente asociados con la droga (Arroyo et al. 1998; Weiss et al. 2000). Los estímulos ambientales condicionados a refuerzos primarios (comida, droga) adquieren propiedades reforzantes (Arroyo et al. 1998; Deroche-Gamonet, Belin, Piazza 2004; Weiss et al. 2000), de forma que su presentación es capaz de aumentar el deseo por la droga e inducir la recaída. Los estímulos ambientales también son utilizados como indicadores de la disponibilidad de la droga, de forma que la aparición del estímulo proporciona una alta motivación en el inicio del comportamiento requerido para su obtención.

Ahora bien, estos protocolos no reflejan el proceso completo de adicción desarrollado en humanos, ya que no discriminan entre la pura conducta de autoadministración y la conducta adictiva caracterizada por la pérdida de control sobre el consumo, el aumento desmesurado del deseo de consumir la droga o "craving" y la búsqueda compulsiva de la droga.

### 6.3. Modelos animales de adicción basados en criterios diagnósticos

Un gran avance en el campo de la adicción ha sido el desarrollo de protocolos específicos para disociar el estado de autoadministración y el de adicción. Trabajos pioneros como el de Wolffgramm (Wolffgramm and Heyne 1995), así como los desarrollados posteriormente por Robinson (Robinson and Kolb 2004), Deroche (Deroche-Gamonet, Belin, Piazza 2004) y Vanderschuren (Vanderschuren and Everitt 2004) demuestran que la búsqueda de droga aún cuando el animal sabe que no está disponible, la inusual alta motivación por la sustancia (“craving”), su uso continuado a pesar de las consecuencias adversas y, la mayor propensión a la recaídas pueden modelarse en el laboratorio con éxito.

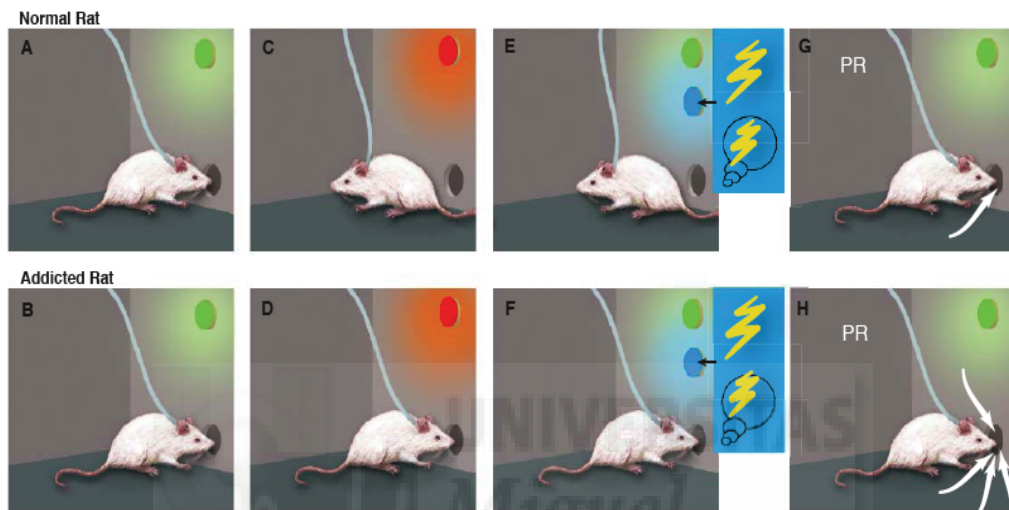
En estos modelos se establecen 3 criterios o síntomas de dependencia, y se evalúa si los animales cuando se autoadministran cocaína durante un periodo prolongado de tiempo desarrollan alguno de estos criterios (Figura 9):

- ✓ El primer criterio diagnóstico es ver si el animal continúa con la conducta de búsqueda de droga incluso cuando sabe que la droga no está disponible.
- ✓ El segundo criterio es estudiar si el animal continúa administrándose droga incluso cuando esto tiene consecuencias adversas para él. Esta conducta se evalúa imponiendo condiciones ambientales aversivas que extinguen el consumo en un animal normal, pero que no influyen en el consumo de un animal “adicto”.
- ✓ El último criterio seleccionado es la alta motivación o deseo hacia la droga. El deseo patológico o “craving” lleva a animales y humanos a realizar un sobreesfuerzo para obtener la droga. Este aumento desmesurado del deseo de consumir la droga se evalúa imponiendo requerimientos de respuesta cada vez más elevados, denominado razón progresiva, hasta alcanzar el llamado punto de corte o “breaking point”, en el que el coste de la respuesta supera el nivel de motivación del sujeto y la conducta se detiene o cambia hacia otro estímulo.

Transcurrido un largo período de autoadministración de droga, se observa que aunque todos los animales se autoadministran ávidamente cocaína, el 41% no cumple ninguno de los tres criterios establecidos, el 28% cumple únicamente un criterio, el 14% dos y, al igual que ocurre en la población humana, sólo un porcentaje del 17% alcanza los 3 criterios de adicción; pero

además, este mismo porcentaje de animales es el que manifiesta una especial propensión a las recaídas, altos niveles de ansiedad, impulsividad y una mayor respuesta a la novedad, todos ellos rasgos conductuales que caracterizan a los individuos dependientes.

Estos modelos animales permiten aproximarnos al proceso completo de adicción que tiene lugar en los humanos.



(Robinson 2004)

**Figura 9. Modelo animal de adicción basado en tres criterios diagnósticos. 1) Búsqueda compulsiva de droga.** La luz verde indica al animal que la droga esta disponible y la roja que no esta disponible. Ratas adictas y no adictas aprenden a autoadministrarse cocaína al mismo ritmo, pero al prolongar el periodo de las sesiones las ratas adictas se autoadministran mas infusiones de droga que las no adictas. Cuando la luz roja esta encendida, las ratas no adictas dejan de asomar el morro al agujero (A y C) mientras que las adictas continúan con la conducta de búsqueda a pesar que saben que no recibirán cocaína (B y D). **2) Persistencia en el consumo a pesar de las consecuencias adversas.** La luz verde señala que la droga esta disponible, y una luz azul simultánea indica al animal que tras la infusión recibirá un shock eléctrico en las patas. Las ratas no adictas disminuyen el número de respuestas mientras que las adictas siguen respondiendo (E y F). **3) Alta motivación por la droga.** Bajo un protocolo de razón progresiva, los animales adictos tienen un punto de corte más elevado, es decir trabajan mucho más para obtener la droga que las ratas no adictas, las cuales llegan un momento que no responden porque el esfuerzo no les compensa (G y H).



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## Hipótesis de trabajo

El Informe Mundial sobre drogas de las Naciones Unidas para el año 2010 reveló que el 5% de la población mundial adulta ha consumido alguna droga ilícita al menos una vez en los últimos 12 meses. Sin embargo, incluso cuando nos referimos a drogas potencialmente adictivas como la cocaína, sólo entre el 16 y el 20% de los consumidores hacen la transición del uso recreativo de las drogas a un patrón de consumo adictivo (NIDA Notes 2002; Wagner and Anthony 2002). Por esta razón en el campo de la adicción algunas de las preguntas que intentamos responder son: ¿por qué sólo algunos individuos hacen la transición del uso recreativo de la droga, a un patrón de búsqueda y consumo compulsivo de ella?, y ¿cuales son los factores de vulnerabilidad o susceptibilidad para dicha transición?

Como hemos visto existen numerosos factores que influyen en el desarrollo de la adicción, entre ellos los cambios neurobiológicos a largo plazo que induce el consumo de la droga. Nosotros proponemos la evaluación de la sensibilización motora, marcador de la sensibilización neural sobre la que se asienta el desarrollo de la conducta adictiva, como posible factor de vulnerabilidad a la adicción. Un hecho tremendamente importante en la sensibilización para la adicción es la existencia de diferencias individuales en la susceptibilidad a sensibilizar. Sabemos que, algunos individuos sensibilizan rápidamente y otros son más resistentes. Nuestra hipótesis es que los primeros serían los individuos candidatos a realizar el cambio de consumidores a adictos.

Para alcanzar el objetivo de nuestro trabajo realizaremos estudios de sensibilización motora con drogas de abuso y se correlacionarán las diferencias individuales con la mayor o menor susceptibilidad a desarrollar una conducta adictiva y con la expresión de genes implicados en adicción, aprendizaje y memoria.

## Objetivos

El objetivo de este trabajo es la evaluación de la sensibilización motora como posible factor de vulnerabilidad a la adicción y el estudio de la presencia o ausencia de modulación SPérgica, utilizando para ello animales knockout para el receptor NK1. Para el desarrollo de este estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la adquisición y expresión de la sensibilización motora inducida por cocaína y morfina, y caracterizar la implicación de la Sustancia P en este proceso.
2. Establecer subpoblaciones de acuerdo al grado de sensibilización locomotora inducida por cocaína y morfina: animales sensibilizadores y no sensibilizadores.
  - 2.1. Analizar diferencias en la expresión de la sensibilización entre animales sensibilizadores y no sensibilizadores de cada genotipo.
  - 2.2. Determinar el porcentaje de animales NK1+/+ y NK1-/- sensibilizadores y no sensibilizadores, y analizar la prevalencia de cada una de estas subpoblaciones.
3. Caracterizar la implicación de la SP en el desarrollo y establecimiento de un comportamiento operante de autoadministración de comida:
  - 3.1. Caracterizar la adquisición del comportamiento de autoadministración de comida en animales NK1+/+ y NK1-/-.
  - 3.2. Estudiar si existen diferencias en la motivación por un recompensante natural entre genotipos.
  - 3.3. Correlacionar los niveles de sensibilización locomotora con la motivación por la comida en animales NK1+/+ y NK1-/-.
4. Caracterizar la implicación de la SP en el desarrollo y establecimiento de un comportamiento operante de autoadministración de morfina:
  - 4.1. Caracterizar la adquisición del comportamiento de autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-.
  - 4.2. Estudiar si existen diferencias en la motivación por la morfina entre genotipos.

5. Analizar si la propensión a la sensibilización es un factor de vulnerabilidad para el desarrollo de los criterios que caracterizan la conducta adictiva:
  - 5.1. Investigar si los animales sensibilizadores presentan una mayor motivación por la morfina, y determinar si existe modulación por SP en este proceso.
  - 5.2. Estudiar si existe correlación entre las diferencias interindividuales en la sensibilización motora inducida por morfina y el nivel de persistencia en la búsqueda de droga.
6. Estudiar las bases moleculares de los cambios observados en los ensayos de sensibilización a morfina:
  - 6.1. Análisis de la expresión de genes de expresión temprana  $\Delta$ FosB y Nurr1 en el núcleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal, en los animales expuestos a sensibilización.
  - 6.2. Estudio de genes de expresión tardía inducidos por  $\Delta$ FosB que estén implicados en plasticidad sináptica (CaM-kinasa II, gluR2, BDNF) en las neuronas del núcleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal.
  - 6.3. Establecer correlaciones interindividuales entre la vulnerabilidad a la sensibilización a morfina y los cambios en la expresión génica inducidos por la droga.



## MATERIALES Y MÉTODOS







## 1. Animales de experimentación

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos adultos NK1<sup>-/-</sup> y silvestres (NK1<sup>+/+</sup>). Los ratones originales fueron obtenidos por recombinación homóloga de blastocistos C57BL/6J inyectados con células madre 129/sv que presentaban una disrupción dirigida del gen que codifica el receptor NK1 (De Felipe et al. 1998). Los ratones utilizados en este trabajo fueron obtenidos mediante el cruce de la línea original C57BL/6J x 129/sv con ratones de la cepa no congénita MF1.

Los procedimientos experimentales fueron realizados por la mañana. Los animales fueron estabulados en grupos de 4-5. Las condiciones de estabulación fueron: temperatura ( $22\pm 1$  °C), humedad (55%), iluminación (ciclo luz-oscuridad de 12) y agua y comida *ad libitum*. Para una mejor comprensión, las variaciones en cualquiera de estas condiciones serán comentadas detalladamente en el apartado correspondiente a cada experimento. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Miguel Hernández de Elche y fueron realizados de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC).

## 2. Sensibilización motora

El protocolo y las dosis utilizados para evaluar el proceso de sensibilización locomotora inducida por morfina y cocaína fueron los mismos que los empleados en el trabajo de (Ripley et al. 2002), donde fueron capaces de inducir y mantener sensibilización a estas drogas.

La actividad locomotora horizontal se evaluó en un campo abierto rectangular (5 cm x 10 cm x 10 cm de alto) y bajo condiciones de baja iluminación (40 lux). Los ratones fueron colocados individualmente en el centro del campo y la actividad locomotora fue registrada automáticamente mediante un sistema de videotracking (SMART; Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking. Panlab).

La morfina y la cocaína fueron proporcionadas por el Ministerio de Sanidad y Consumo español. Ambas drogas fueron disueltas en solución salina al 0.9% e inyectadas en un volumen de 10 ml/kg. Los animales del grupo control siguieron el mismo protocolo

experimental excepto que fueron inyectados con salino. La actividad locomotora se registró 10 min. después de la inyección matinal con morfina (15 mg/kg i.p.), cocaína (10 mg/kg i.p.) o salino, durante un período de 15 min., y fue expresada como distancia recorrida (cm) durante la sesión completa.

Con la finalidad de obtener una actividad locomotora basal, los animales fueron habituados al campo abierto durante los 3 primeros días. El día 4 comenzó el tratamiento crónico con droga o salino (2 inyecciones/día cada 8h) durante 15 días consecutivos, cuantificándose la actividad locomotora cada 3 días (días 7, 10, 13, 16 y 19). Además, los efectos locomotores agudos inducidos por morfina, cocaína y salino fueron evaluados tras la primera inyección del día 4. Tras cinco días de periodo libre de droga (días 20-25), los animales recibieron una única inyección de droga, evaluándose de nuevo la actividad locomotora (día 26) (Figura 9).

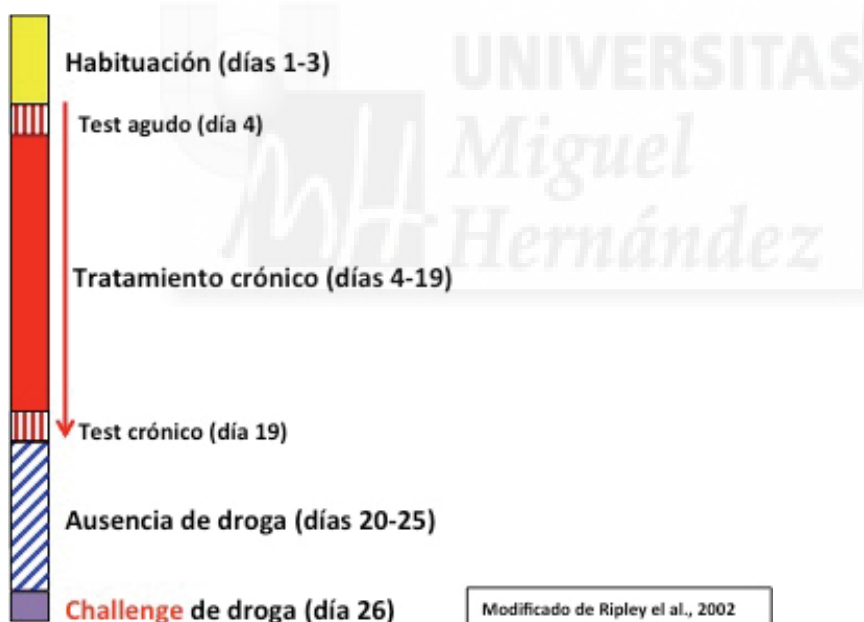


Figura 9. Representación esquemática del protocolo utilizado en la evaluación de la sensibilización locomotora inducida por morfina y cocaína en animales NK1.

### 3. Autoadministración de morfina

#### Condiciones de experimentación

Durante esta fase del experimento el ciclo luz-oscuridad (12 h-12 h) se mantuvo invertido para que los animales trabajaran durante la fase de oscuridad, en la cual su actividad es mayor.

#### Equipo

Los experimentos de autoadministración se llevaron a cabo en 8 cajas de Skinner (Panlab, S.L.U. Spain) para ratón, ventiladas e insonorizadas y controladas por una interfase y un programa informático (PackWin v.1.2.13). Cada caja dispone de dos palancas. La respuesta en la palanca activa producía la infusión de droga, mientras que la respuesta en la palanca inactiva no tenía consecuencias aunque nos permitió estimar la cantidad de actividad inespecífica del animal a lo largo de la sesión. La posición de las palancas se contrabalanceó entre los animales, pero permaneció constante para cada animal durante todo el experimento.

#### Protocolo

##### Aprendizaje operante con comida

Durante los 3 días previos al inicio del aprendizaje operante se restringió el acceso de los ratones a la comida; se les proporcionó 3.5 g de comida/día, con el fin de alcanzar el 95% de su peso inicial. Este régimen de privación fue mantenido a largo de todo el protocolo de aprendizaje operante con comida. Al cuarto día del inicio de la restricción de alimento, los ratones comenzaron las sesiones de entrenamiento donde aprenden a apretar una palanca para obtener pellets de comida (Noyes Precision Pellets, Research Diets Inc., USA). Las sesiones de entrenamiento (1 h/día) se llevaron a cabo 6 días a la semana y durante estas sesiones la luz roja de la caja de Skinner permaneció encendida. Cada sesión comenzaba con la eyección de la palanca activa y finalizaba con su retracción. Los ratones empezaron el entrenamiento con un programa de

refuerzo de razón fija 1 (FR1). Un estímulo condicionado luminoso (EC; luz blanca), localizado encima de la palanca activa, era asociado contingentemente con la obtención del refuerzo. Después de cada refuerzo se estableció un periodo de “time-out” de 10 s durante el cual la respuesta en la palanca activa no proporcionaba recompensa. Todas las respuestas en la palanca activa e inactiva fueron registradas durante el time-out. La sesión finalizaba después de 1 h o de la obtención de 100 refuerzos. Se establecieron los siguientes criterios de adquisición: a) 80% de estabilidad en la respuesta b) 75% de respuestas en la palanca activa y c) un mínimo de 10 refuerzos por sesión. Una vez que los criterios de adquisición fueron alcanzados se pasó a un programa de refuerzo de razón fija 3 (FR3) y posteriormente, al de razón progresiva (PR) en el cual los requerimientos en la respuesta para obtener un refuerzo escalaban según la siguiente serie: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. La sesión de PR fue realizada solamente una vez, y finalizaba tras 2 h o transcurrida 1 h sin haber recibido un refuerzo. El “breaking point” (BP) o punto de corte alcanzado para extinguir la conducta de autoadministración fue determinado para cada animal. Después de cada sesión los ratones eran estabulados en sus cajas.

### **Cirugía de implantación del catéter intravenoso**

Durante, al menos, 48 h antes de la cirugía los animales tuvieron acceso a la comida *ad libitum*. Los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con ketamina/xilacina a una dosis de 100/10 mg/kg. La implantación del catéter intravenoso (i.v.) se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito por Caine et al. (Caine, Negus, Mello 1999) aunque con ligeras modificaciones. El catéter consistía en tubo de plástico silastic de 6 cm de longitud (0.3 mm diámetro interno, 0.6 mm diámetro externo) (Silastic®, Dow Corning, Houdeng-Goegnies, Belgium) ajustado a una cánula de acero de calibre 22 (Semat, Herts, Inglaterra) previamente doblada en ángulo recto y fijada a un soporte de cemento dental (Dentalon Heraeus Kulzer, Alemania) con una malla de nylon en su base (ver figura 10). Durante la cirugía, se introdujo 1.3 cm del catéter en

la vena yugular derecha a la cual se fijó con hilo de sutura. La parte restante del catéter se dispuso subcutáneamente hasta la cánula, saliendo al exterior por la región escapular media. Todas las incisiones fueron suturadas y recubiertas con una pomada antibiótica (Positon, Iquinoso Farma, España).

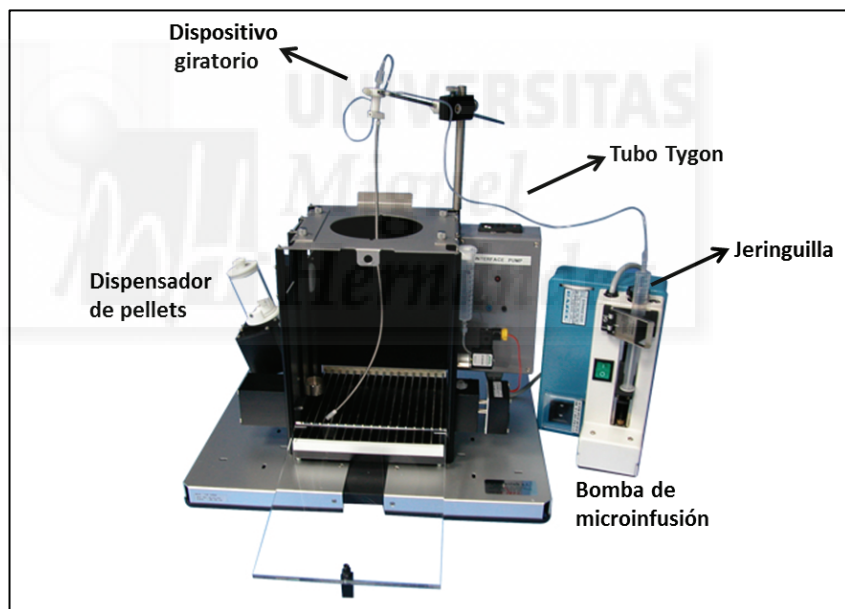


**Figura 10. Imagen de un catéter intravenoso.** El catéter consta de un tubo de plástico flexible, cuya parte final es la que se introduce en la yugular del animal, ajustado a una cánula de acero en ángulo recto y fijada a un soporte de cemento dental que le aporta estabilidad. El extremo de la cánula que queda fuera del animal se acopla a un sistema de perfusión a través del cual se infunde la droga.

Con el fin de mantener la permeabilidad del catéter, se lavaba diariamente con heparina en solución salina a 30 UI/ml (H3393, Sigma). Al finalizar el protocolo de autoadministración se comprobó la viabilidad de los catéteres mediante la infusión de 0.1 ml del colorante vital azul de Evans (E-2129, Sigma) al 1% en PBS 0.1M pH 7.4. Si el catéter continuaba viable el ratón adquiría coloración azul en los 10 s posteriores a la infusión, de no ser así el ratón era excluido de los análisis estadísticos.

### **Autoadministración de droga**

Las sesiones de autoadministración de droga comenzaron tres días después de la cirugía. La morfina era inyectada a través de una jeringuilla, acoplada a una bomba de microinfusión (PHM-100A, Med-Associates, Georgia, VT, USA), que se conectaba a través de un tubo Tygon (diámetro exterior 0.96 mm, Portex Fine Bore Polietileno Tubing, Portex Limited, Kent, Inglaterra) a un dispositivo giratorio con un único canal de líquido (375/25, Laboratorios Instech, Plymouth Meeting, PA, USA) y de ahí, al catéter i.v. del ratón. El dispositivo giratorio estaba montado en un brazo contrabalanceado colocado sobre la caja de Skinner (ver figura 11).



**Figura 11. Caja de condicionamiento operante (Panlab, Harvard Apparatus).**

Las sesiones de autoadministración de morfina se llevaron a cabo 7 días a la semana, con una única sesión diaria de 2 h. Estas sesiones eran divididas en periodos de 30 min. en los que la droga estaba disponible (D) y periodos de 10 min. en los que no lo estaba (ND). La secuencia temporal de estos periodos a lo

largo de cada sesión fue: D-ND-D-ND-D. Durante los periodos D la luz de la caja de Skinner permanecía encendida y la presión sobre la palanca activa producía una infusión de morfina (0.2 mg/kg en un volumen de 12  $\mu$ l y en 2 s), mientras que durante los periodos ND la luz de la caja de condicionamiento operante permanecía apagada y la presión sobre la palanca activa no tenía consecuencias (ver figura 12). El primer periodo D de cada sesión comenzaban con la eyección de la palanca activa y la infusión de un “priming” de droga. Los ratones comenzaban con un programa de refuerzo de FR1, en los que la obtención del refuerzo se asociaba contingentemente a un estímulo luminoso (luz blanca; EC) localizado encima de la palanca activa. Después de cada refuerzo se estableció un periodo de “time-out” de 10 s durante el cual la respuesta en la palanca activa no proporcionaba recompensa. Tanto las respuestas en la palanca inactiva como las respuestas durante los “time-out” y los periodos ND fueron registradas. Conforme los animales superaban los criterios de adquisición (los mismos descritos para el aprendizaje con comida) pasaban a un programa FR3 y, por último a un programa de PR. La sesión de PR fue realizada bajo las condiciones de periodo D, y siguiendo el protocolo descrito para el aprendizaje operante con comida.

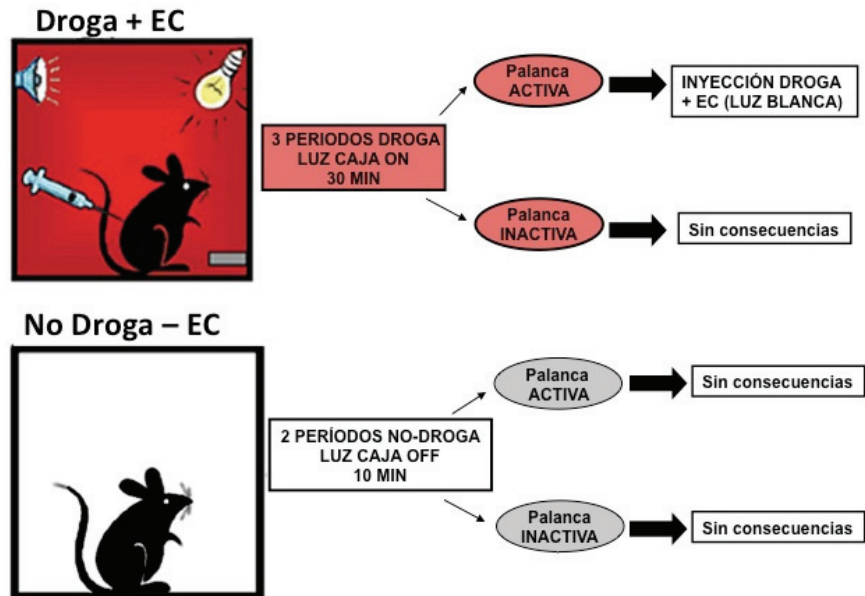


Figura 12. Representación esquemática del protocolo empleado de autoadministración de morfina. EC (estímulo condicionado; luz blanca).

#### 4. Análisis de la expresión génica

##### Obtención del tejido

Para la evaluación del tratamiento crónico con morfina sobre la expresión génica los animales fueron decapitados veinticuatro horas después de la finalización del protocolo de sensibilización inducido por la droga, es decir un día después del día 26 de dicho protocolo (ver figura 9). Para el análisis del tratamiento agudo con morfina sobre la expresión génica los animales fueron decapitados 24 horas después de la administración de una única dosis de morfina (15 mg/kg i.p.). En ambos casos los cerebros fueron extraídos, y el cuerpo estriado, núcleo accumbens y corteza prefrontal de cada animal disecados, pesados y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento.



### **Extracción de ARN**

Para la extracción del ARN total se utilizó el RNeasy Micro Kit (KIAGEN), que permite obtener hasta 45 microgramos de ARN a partir de cantidades muy pequeñas de material biológico. Un máximo de 5 mg de tejido de cada área cerebral fueron homogeneizados en un volumen total de 350  $\mu$ l de tampón de homogeneización. Para la extracción de ARN se siguieron las instrucciones detalladas en el kit, obteniéndose un volumen final de ARN eluido de 12  $\mu$ l para todas las muestras. La concentración y pureza del ARN fue determinada mediante un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo SCIENTIFIC).

### **Retrotranscripción**

Para la síntesis del ADN complementario (cDNA), el total de ARN (12  $\mu$ l) obtenido fue retrotranscrito mediante un kit de transcripción inversa de alta capacidad (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat. N° 4368813 Applied Biosystems). La preparación y condiciones de la retrotranscripción (RT) fueron las recomendadas por el fabricante. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20°C hasta su análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

### **PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)**

Las RT-qPCR se realizaron por triplicado para cada muestra mediante sondas TaqMan tanto para cada gen diana como para el control endógeno dado por la  $\beta$ -actina (ver tabla II). El sistema de sondas Taqman está basado en sondas marcadas mediante dos fluorocromos: un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (quencher). Esta sonda hibrida en la parte central del producto de PCR, de forma que mediante la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa se produce la liberación del quencher y por tanto, la emisión de fluorescencia.

Para llevar a cabo las reacciones se utilizó TaqMan Universal PCR Master Mix (N° #Cat.4304437, Applied Biosystems). Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron mediante un sistema de detección de secuencias 7300 ABI PRISM (Applied Biosystems) y, bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Los cálculos de la expresión relativa se realizaron siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001) y, la expresión génica relativa fue calculada respecto a la expresión del mismo gen en los animales control (no tratados).

Tabla II. Sondas TaqMan empleadas en la RT-qPCR

GEN	Especie	ID Ensayo
$\Delta$ FosB	<i>Mus musculus</i>	Mm00500401_m1
Nurr 1	<i>Mus musculus</i>	Mm00443056_m1
CaM-kinase II	<i>Mus musculus</i>	Mm00437967_m1
GluR2	<i>Mus musculus</i>	Mm00442822_m1
BDNF	<i>Mus musculus</i>	Mm00432069_m1
MAP2	<i>Mus musculus</i>	Mm00485230_m1
$\beta$ -Actina	<i>Mus musculus</i>	Mm000607939_s1

## 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante los programas SPSS (Statistical Program for Social Science) en su versión 16 para Mac y GraphPad Prism en su versión 4.0 para Windows.

En el caso de comparar únicamente dos grupos experimentales, el análisis se realizó mediante el test de la t (t-test). En todos los casos, los grupos experimentales analizados no estaban relacionados por lo que se seleccionó el unpair t-test.

En el estudio de la correlación entre dos variables se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) y su correspondiente p valor (p). Si el valor de r es positivo y  $p < 0,05$ , evidencia que las dos variables están correlacionadas de manera significativa.

En el caso de analizar una única variable dependiente, se utilizó el modelo lineal generalizado (GzLM) sin medidas repetidas. Este método estadístico se caracteriza por ser una herramienta más flexible que los modelos lineales generales (GLM) debido a que se pueden elegir distintos tipos de distribución y diferentes estructuras de la covariancia de los datos de las medidas repetidas. Además no se elimina un sujeto con valores perdidos y no requiere las condiciones de aplicación de normalidad y homogeneidad de variancias.

En el caso del análisis mediante medidas repetidas y debido a que en algunos casos no se cumplieron los criterios esenciales para realizar el estudio mediante GLM, se utilizó en todos los experimentos un análisis GzLM con medidas repetidas (ecuaciones estructurales generalizadas; GEE; (Hardin JM 2003) bajo una distribución normal. La significación de los efectos estadísticos encontrados mediante este procedimiento se determinó mediante la prueba de chi-cuadrado de Wald usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida.

Los factores inter e intra-sujetos serán comentados en los resultados de cada experimento para una mejor comprensión. En el caso de haber encontrado interacciones estadísticamente significativas, se realizaron las descomposiciones sucesivas apropiadas.

El criterio de significación en todos los casos se estableció en  $p < 0,05$ , y la significación marginal ( $0,1 > p > 0,05$ ) se muestra sólo como información adicional.



## RESULTADOS



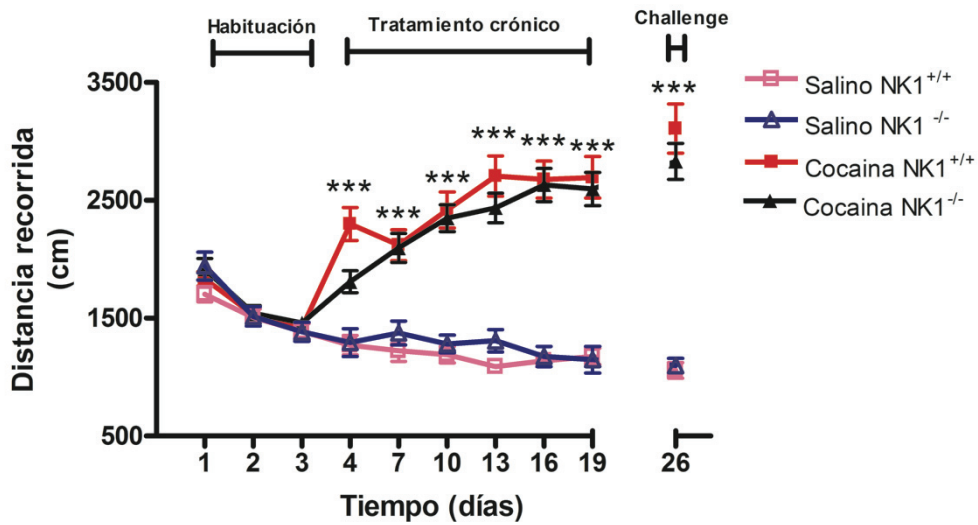


## 1. Sensibilización locomotora inducida por cocaína en animales NK1+/+ y NK1-/-

En este experimento analizamos la adquisición y expresión de la sensibilización locomotora inducida por cocaína en animales NK1+/+ y NK1-/- (Figura 1).

Los días 1, 2 y 3 del protocolo de sensibilización, los animales fueron expuestos durante 15 min. al campo abierto con la finalidad de ser habituados al ambiente y la actividad locomotora registrada durante la habituación fue similar entre grupos. El posterior tratamiento con cocaína (10 mg/kg i.p.) produjo un incremento en la distancia recorrida de ambos genotipos. Para analizar la sensibilización locomotora inducida por cocaína se utilizó el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos y la dinámica temporal como factor intrasujetos (con 10 niveles). El GEE reveló un efecto de tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 145,110$   $p<0,001$ ) y de tiempo (Wald  $\chi^2(9)= 221,726$ ,  $p<0,001$ ), así como una interacción tratamiento x tiempo (Wald  $\chi^2(9)= 273,206$ ,  $p<0,001$ ). La descomposición de la interacción reveló que tanto la administración aguda como el tratamiento crónico con cocaína produjeron un incremento locomotor similar en ambos genotipos. Estos resultados sugieren que la adquisición de sensibilización motora inducida por cocaína es independiente del genotipo, observándose tanto en animales NK1-/- como NK1+/+.

Una semana tras la finalización del tratamiento crónico con cocaína, los animales recibieron un "challenge" de cocaína (10 mg/kg, i.p.) o salino, con la finalidad de evaluar el mantenimiento de la sensibilización locomotora inducida por esta droga. Los animales de ambos genotipos mostraron un robusto mantenimiento de la sensibilización el día 26, incrementando incluso la actividad locomotora respecto al día 19. Estos datos muestran que la expresión de sensibilización motora inducida por cocaína es independiente del genotipo, observándose tanto en animales NK1-/- como silvestres.



**Figura 1. Sensibilización locomotora inducida por cocaína (10 mg/kg, i.p.) en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>.** Cada punto representa la media  $\pm$  S.E.M (n=49-51/grupo tratado; n=22/grupo salinos) de la distancia recorrida durante la habituación (días 1-3), el tratamiento crónico (días 4-19), y tras un "challenge" de droga o salino (día 26). El análisis GEE mostró que la administración de cocaína incrementó la distancia recorrida en ambos genotipos comparado con su respectivo grupo salino (\*\*\*) p<0,001).

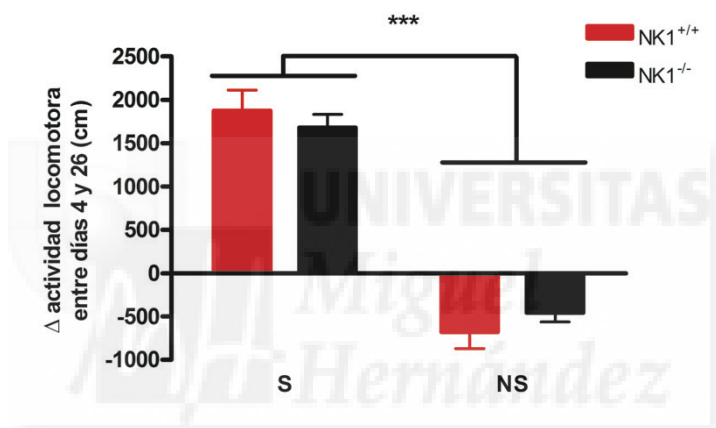
## 2. Clasificación de la población según el grado de sensibilización locomotora inducida por cocaína en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>

Los animales fueron clasificados, como sensibilizadores (S) y no sensibilizadores (NS), en función del grado de sensibilización locomotora expresado el día 26 del protocolo de sensibilización. De forma que, un ratón se consideró como sensibilizador cuando en la fase de expresión de la sensibilización su nivel de locomoción aumentó al menos en 1000 cm [(locomoción registrada el día 26 de administración de droga) - (locomoción aguda, día 4) > 1000 cm]. Por el contrario, se consideró como no sensibilizador (NS) aquel animal que en la fase de expresión de la sensibilización mostró un incremento en el nivel de locomoción menor a 100 cm [(locomoción registrada el día 26 de administración de droga) - (locomoción aguda, día 4) < 100 cm]. Los animales que no cumplieron ninguno de los criterios anteriores fueron



eliminados del estudio.

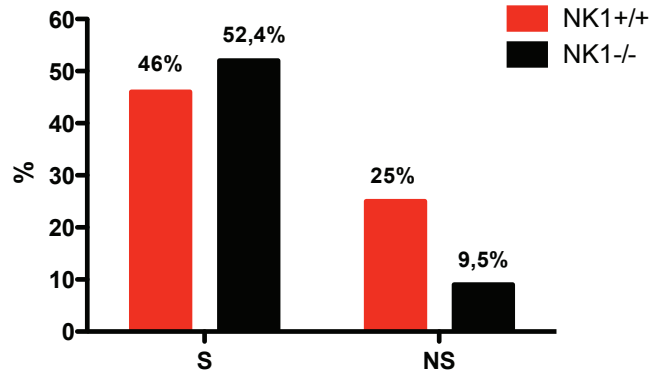
El análisis del incremento de la actividad locomotora inducido por cocaína (10 mg/Kg i.p.) en animales sensibilizadores y no sensibilizadores de ambos genotipos (Fig. 2) se realizó mediante el modelo lineal generalizado (GzLM). Este modelo reveló un efecto de sensibilización (Wald  $\chi^2(1)= 100,070$ ;  $p<0,001$ ) mientras que no mostró efecto ni de genotipo ni interacción genotipo x sensibilización. Estos resultados muestran que los animales sensibilizadores independientemente del genotipo mostraron un incremento en la actividad locomotora entre la primera y la última inyección de cocaína, mientras que los no sensibilizadores manifestaron una reducción.



**Figura 2. Expresión de sensibilización locomotora inducida por cocaína (10 mg/kg i.p.) en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M (n=17-20/grupo sensibilizadores; n=5-10/grupo no sensibilizadores) del incremento de la actividad locomotora entre los días 4 y 26. El análisis GzLM mostró que el tratamiento con cocaína (10 mg/Kg i.p.), independientemente del genotipo, indujo un incremento en la actividad locomotora en los animales sensibilizadores vs. los no sensibilizadores (\*\*\*)  $p<0,001$  vs. NS).

La clasificación de la población según el grado de sensibilización locomotora inducida por cocaína indica que el porcentaje de animales sensibilizadores y no sensibilizadores es equiparable entre genotipos (Fig. 3). El 46% de los animales NK1<sup>+/+</sup> sensibilizan a cocaína frente al 25% que no sensibiliza, mientras que para los animales transgénicos el 52,4% expresa sensibilización inducida por cocaína *versus* al 9,5% que no la expresa. Cabe resaltar que el porcentaje de animales descartados fue similar en ambos genotipos (29% en NK1<sup>+/+</sup> y

38,1% en NK1-/-).



**Figura 3. Clasificación según el grado de sensibilización locomotora inducida por cocaína (10 mg/kg i.p.) en animales NK1+/+ y NK1-/-.** Las barras representan los porcentajes de animales, de cada genotipo, sensibilizadores y no sensibilizadores a cocaína (n=17-20/grupo sensibilizadores; n=5-10/grupo no sensibilizadores). La N experimental inicial fue de 38 animales NK1+/+ y 40 NK1-/-.

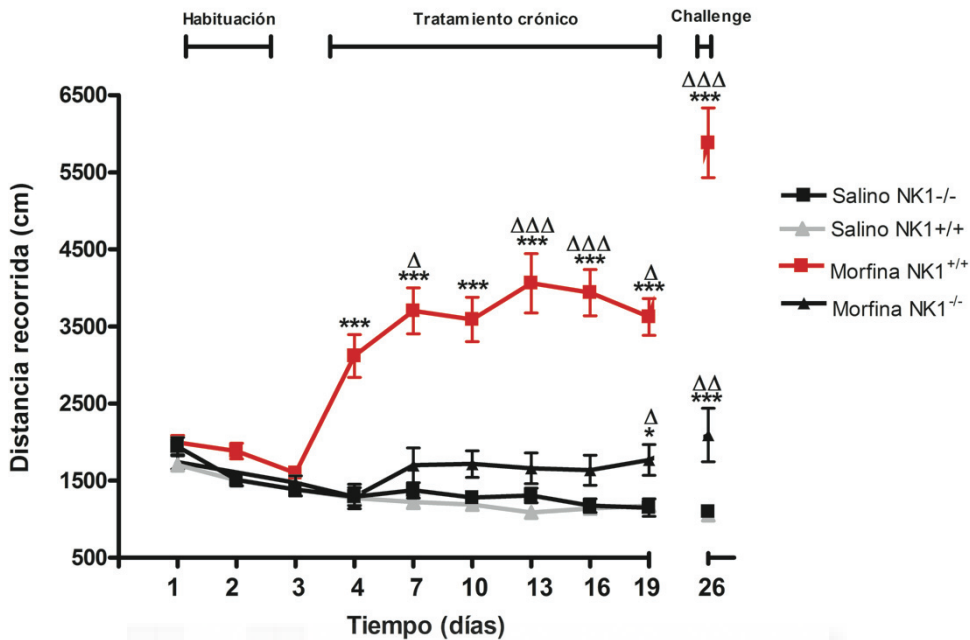
### 3. Sensibilización locomotora inducida por morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-

En este experimento analizamos la adquisición y expresión de sensibilización locomotora inducida por 15 mg/Kg i.p. de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/- (Fig. 4), siguiendo el mismo protocolo descrito para la sensibilización locomotora inducida por cocaína (apartado 1). Para ello se utilizó el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos y la dinámica temporal como factor intrasujetos (con 10 niveles).

El análisis estadístico de los datos reveló efecto de tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 442,645$   $p<0,001$ ), tiempo (Wald  $\chi^2(9)= 87,659$ ,  $p<0,001$ ) y genotipo (Wald  $\chi^2(9)= 206,485$ ,  $p<0,001$ ), así como una interacción tratamiento x tiempo x genotipo (Wald  $\chi^2(9)= 87,768$ ,  $p<0,001$ ), tratamiento x tiempo (Wald  $\chi^2(9)= 205,661$ ,  $p<0,001$ ), tratamiento x genotipo (Wald  $\chi^2(1)=$

223,242,  $p < 0,001$ ) y genotipo x tiempo (Wald  $\chi^2(9) = 83,436$ ,  $p < 0,001$ ). La actividad locomotora registrada durante el período de habituación fue similar entre los grupos experimentales. La descomposición de la interacción mostró que tanto la administración aguda de morfina (15 mg/Kg i.p.) como el tratamiento crónico con la droga producen un incremento estadísticamente significativo en la actividad locomotora de los animales silvestres comparado con los animales del mismo genotipo tratados con salino. Sin embargo, la administración aguda de morfina no tiene efecto sobre la actividad locomotora de los ratones NK1-/- y el tratamiento crónico con esta droga en los animales transgénicos tampoco produce un incremento en la locomoción estadísticamente significativo frente a su respectivo grupo salino hasta el día 19. Además, tanto la administración aguda como crónica de morfina produce un incremento de la actividad locomotora mucho mayor en animales silvestres que mutantes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa desde el día 4 al 19. El conjunto de estos resultados nos indican que la adquisición de sensibilización motora inducida por morfina es dependiente del genotipo, observándose de forma mucho más robusta en animales silvestres que en NK1-/-, los cuales mostraron una leve respuesta únicamente el día 19.

Una semana tras la finalización del tratamiento crónico con morfina, los animales recibieron un "challenge" de droga (15 mg/kg, i.p.) o salino, con la finalidad de evaluar el mantenimiento de la sensibilización locomotora. Los animales de ambos genotipos mostraron el mantenimiento de la sensibilización el día 26. Sin embargo, la expresión de la sensibilización es mucho más robusta en los animales NK1+/-, mostrando un incremento de la actividad locomotora respecto al día 19 siete veces mayor que los ratones NK1-/. Estos datos muestran que la expresión de sensibilización motora inducida por morfina difiere entre genotipos, advirtiéndose en animales NK1-/- una débil expresión de la sensibilización.



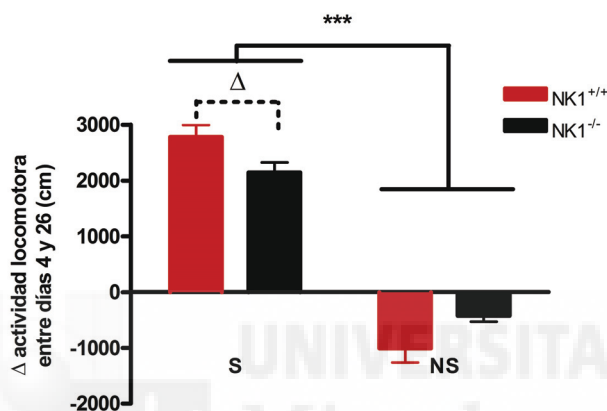
**Figura 4. Sensibilización locomotora inducida por morfina (15 mg/kg, i.p.) en animales NK1+/+ y NK1-/-.** Cada punto representa la media  $\pm$  S.E.M (n=22/grupo) de la distancia recorrida durante la habituación (días 1-3), tratamiento crónico (días 4-19), y tras un "challenge" de droga o salino (día 26). El análisis GEE mostró que la administración de morfina incrementó la distancia recorrida comparado con los grupos tratados con salino (\* p<0,05 y \*\*\* p<0,001 vs. grupo salino) y con el primer día de administración de la droga ( $\Delta$ p<0,05,  $\Delta\Delta$ p<0,01  $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001 vs. día 4 mismo genotipo).

#### 4. Clasificación de la población según el grado de sensibilización locomotora inducida por morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-

Los animales fueron clasificados siguiendo los mismos criterios que los establecidos para la sensibilización motora a cocaína.

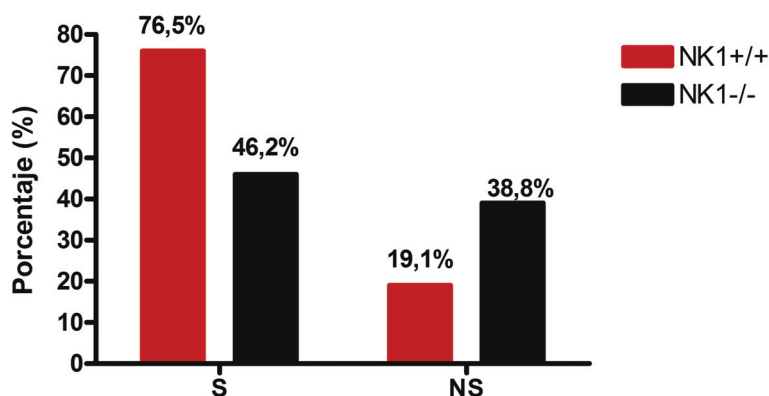
El análisis del incremento de la actividad locomotora inducido por morfina (15 mg/Kg i.p.) en animales sensibilizadores y no sensibilizadores de ambos genotipos (Fig. 5) se realizó mediante el modelo lineal generalizado (GzLM). Este modelo reveló un efecto de sensibilización (Wald  $\chi^2(1)= 188,475$ ; p<0,001) e interacción genotipo x sensibilización (Wald

$\chi^2(1)= 6,914$ ;  $p<0,01$ ), mientras que no mostró efecto de genotipo. La descomposición de la interacción mostró una mayor expresión de la sensibilización inducido por el tratamiento con la morfina en los animales sensibilizadores de ambos genotipos comparado con los animales no sensibilizadores. Además, esta descomposición reveló que dentro de los animales sensibilizadores a morfina, los animales mutantes muestran un incremento en la actividad locomotora inducida por esta droga menor que los silvestres ( $^{\wedge}p<0,05$  NK1<sup>-/-</sup> S vs. NK1<sup>+/+</sup> S).



**Figura 5. Expresión de sensibilización locomotora inducida por morfina (15 mg/kg i.p.) en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M (n=25-36/grupo sensibilizadores; n=9-21/grupo no sensibilizadores) del incremento de la actividad locomotora entre los días 4 y 26. El análisis GzLM mostró que el tratamiento con morfina (15 mg/Kg i.p.), independientemente del genotipo, produjo un incremento en la locomoción de los animales sensibilizadores (\*\* $p<0,001$  vs. NS) y que este incremento es menor en NK1<sup>-/-</sup> S ( $^{\wedge}p<0,05$  vs. NK1<sup>+/+</sup> S).

En la clasificación de la población observamos que el porcentaje de animales sensibilizadores y no sensibilizadores difiere entre genotipos (Fig. 6). En los animales NK1<sup>+/+</sup> observamos que el 76,5% de los animales sensibilizan a morfina frente al 19,1% que no sensibiliza. Sin embargo, en los animales NK1<sup>-/-</sup> el porcentaje de animales que expresan sensibilización a morfina (46,2%) es prácticamente el mismo que el porcentaje de animales que no la expresa (38,8%). El porcentaje de animales descartados fue superior en el caso de los NK1<sup>-/-</sup> (15%) que en de los NK1<sup>+/+</sup> (4,4%).



**Figura 6. Clasificación según el grado de sensibilización locomotora inducida por morfina (15 mg/kg i.p.) en animales NK1+/+ y NK1-/-.** Las barras representan los porcentajes de animales, de cada genotipo, sensibilizadores y no sensibilizadores a morfina (n=25-36/grupo sensibilizadores; n=9-21/grupo no sensibilizadores). La N experimental inicial fue de 47 animales NK1+/+ y 54 NK1-/-.

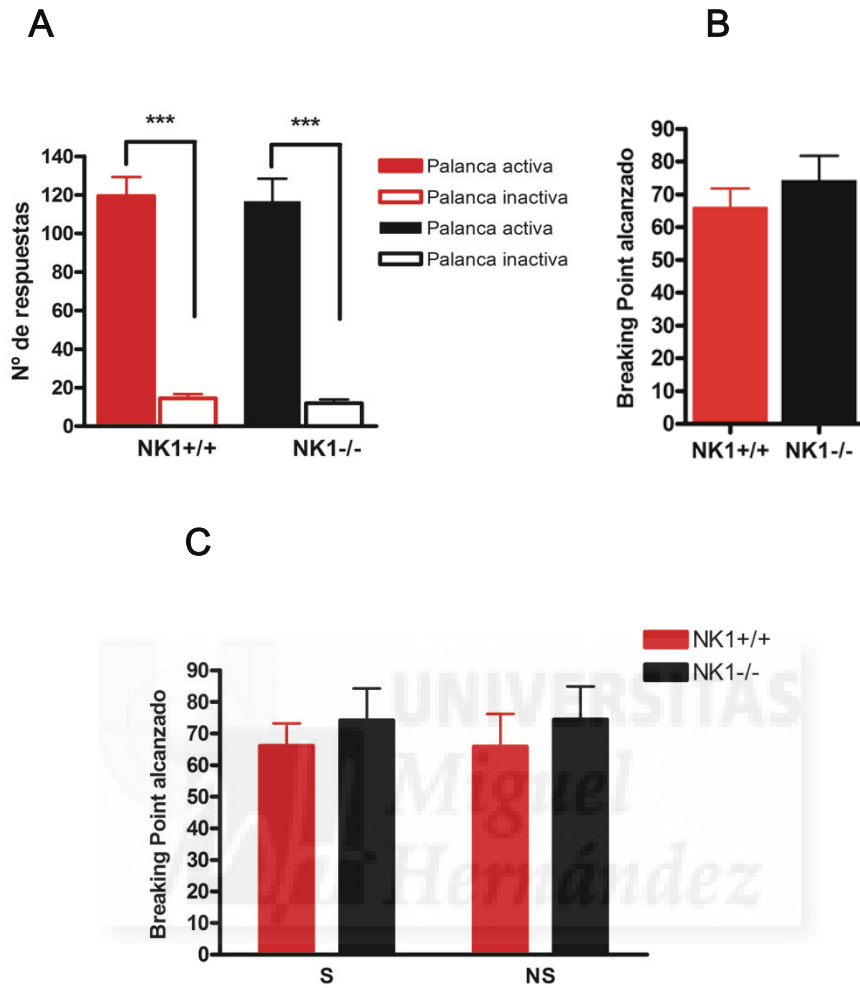
## 5. Autoadministración de recompensantes naturales en animales NK1+/+ y NK1-/- y relación con la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina

Con el objetivo de obtener información acerca del comportamiento operante en respuesta a recompensantes naturales como la comida, nosotros estudiamos el comportamiento de apretar la palanca para obtener un pellet en ratones privados de alimento. Como se muestra en la figura 7A durante el período de entrenamiento con comida los animales de ambos genotipos aprendieron a discriminar con la misma avidez entre la palanca activa e inactiva. El análisis de los datos se realizó mediante el GzLM y reveló un efecto de discriminación entre las palancas activa (PA) e inactiva (PI) (Wald  $\chi^2(1) = 183,921$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que no mostró efecto de genotipo ni interacción genotipo x discriminación de palancas. Además, el tiempo necesario para alcanzar los criterios de adquisición establecidos para los programas de FR1 y FR3 no difiere entre genotipos (unpaired t-test,  $p = 0,0884$ ; NoS y  $p = 0,1420$ ; NoS, respectivamente), siendo respectivamente de  $6,6 \pm 0,4$  sesiones para NK1+/+ y  $5,6 \pm 0,3$  sesiones para NK1-/- y, de  $4,6 \pm 0,3$  sesiones para silvestres y  $4,0 \pm 0,2$  sesiones para mutantes.

Con el fin de evaluar posibles diferencias en la motivación por la comida entre animales NK1+/+ y NK1-/- se realizó una sesión bajo un programa de razón progresiva (PR) en el que los requerimientos en la respuesta para obtener un pellet de comida aumentaban progresivamente. El análisis de los datos no reveló diferencias significativas entre genotipos (unpaired t-test,  $p= 0,3886$ ) en el “breaking point” (BP) o punto de corte alcanzado para extinguir el comportamiento de autoadministración de comida (Figura 7B).

En la figura 7C se muestra la asociación entre los niveles de sensibilización motora con la motivación por la comida que viene dado por el “breaking point”. Estos datos se analizaron utilizando el GzLM y no revelaron diferencias significativas para ninguno de los factores evaluados (genotipo, sensibilización e interacción entre ambos). Estos resultados muestran que la motivación por un recompensante natural es similar en animales sensibilizadores y no sensibilizadores de ambos genotipos.





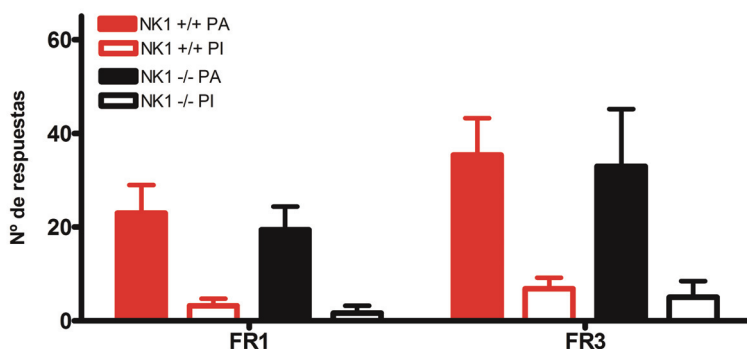
**Figura 7. Comportamiento operante con comida en animales NK1+/+ y NK1-/-.** A) Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M del número de respuestas sobre las palancas activa e inactiva durante 3 sesiones consecutivas (1h/sesión) requeridas para alcanzar los criterios de adquisición de FR1. El análisis GzLM mostró que ambos genotipos aprenden a discriminar entre la palanca activa (PA) e inactiva (PI) (\*\*\*)  $p < 0,001$  PA vs. PI;  $n = 26-39$ /grupo). B) Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M del breaking point alcanzado para extinguir la conducta de autoadministración bajo un protocolo de refuerzo de razón progresiva ( $n = 26-39$ /grupo). C) Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M del BP. El análisis GzLM no mostró efecto de genotipo, sensibilización o interacción genotipo x sensibilización ( $n = 18-28$ /grupo sensibilizadores;  $n = 8-11$ /grupo no sensibilizadores).



## 6. Autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-

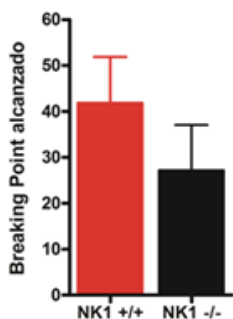
Cabe resaltar que los experimentos de autoadministración de cocaína no pudieron llevarse a cabo ya que la elevada estimulación motora que producía en los animales provocaba que los catéteres dejaran de ser viables en 2 ó 3 días, tiempo insuficiente para completar la adquisición del comportamiento operante de autoadministración.

En los experimentos de autoadministración de morfina se analizó la adquisición del comportamiento de autoadministración de dicha droga (0.2mg/kg/infusión) en animales NK1+/+ y NK1-/. En la figura 8 se observa que los animales de ambos genotipos aprendieron a discriminar entre la palanca activa (PA) e inactiva (PI). Para analizar estos datos se utilizó el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con la discriminación entre palancas y el genotipo como factores intersujetos y el tiempo como factor intrasujetos (con 2 niveles). El GEE reveló un efecto de discriminación entre la palanca activa e inactiva ( $Wald\chi^2(1)= 21,038$ ;  $p<0,001$ ), y una interacción entre palanca x tiempo ( $Wald\chi^2(1)= 6,114$ ;  $p<0,05$ ). Estos resultados indican que los animales de ambos genotipos aprenden a discriminar entre la PA y la PI y además, incrementan el número de respuestas en la palanca activa a medida que aumenta la razón en el programa de autoadministración. Además, no existen diferencias estadísticamente significativas (NoS) entre genotipos en el tiempo necesario para alcanzar los criterios de adquisición establecidos para los diferentes programas; los animales silvestres alcanzaron los criterios de estabilidad para el programa de FR1 en  $4,1 \pm 0,5$  sesiones y los knockout en  $5,4 \pm 0,4$  sesiones (unpaired t-test,  $p= 0,1211$ ; NoS) y, los criterios de estabilidad para el programa de FR3 fueron alcanzados en un tiempo similar por ambos genotipos (NK1+/+ en  $3,1 \pm 0,2$  sesiones y NK1-/- en  $3,4 \pm 0,2$ ; unpaired t-test,  $p= 0,4385$ ; NoS).



**Figura 8. Adquisición de autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M del número de respuestas sobre las palancas activa (PA) e inactiva (PI) durante FR1 y FR3. El análisis GEE mostró que ambos genotipos aprenden a discriminar la PA de la PI ( $p < 0,001$  PA vs. PI;  $n = 20-24$ /grupo) y que el nº de respuestas sobre la PA aumenta con la razón del programa ( $p < 0,05$  FR1 vs. FR3).

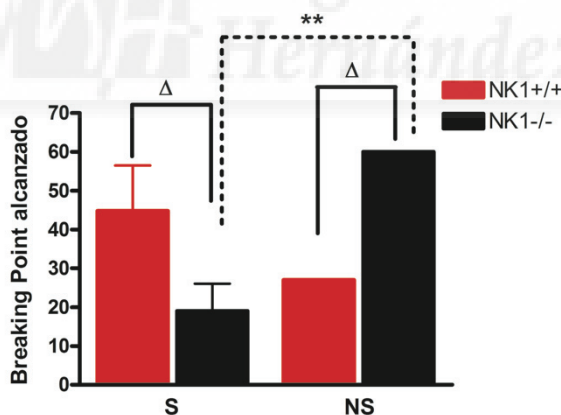
Las propiedades motivacionales de la morfina en animales NK1+/+ y NK1-/- se estudiaron bajo un programa de razón progresiva (PR) en el que los requerimientos en la respuesta para obtener una infusión de esta droga (0,2 mg/kg/infusión) aumentaban progresivamente. El análisis de los datos no reveló diferencias significativas (NoS) entre genotipos (unpaired t-test,  $p = 0,7123$ ;  $n = 5-8$ /grupo) en el "breaking point" (BP) o punto de corte alcanzado para extinguir el comportamiento de autoadministración (Figura 9).



**Figura 9. Motivación por morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-.** A) Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M del breaking point alcanzado para extinguir la conducta de autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/- (unpaired t-test,  $p = 0,7123$  NoS;  $n = 5-8$ /grupo).

## 7. Correlación sensibilización locomotora versus motivación por morfina

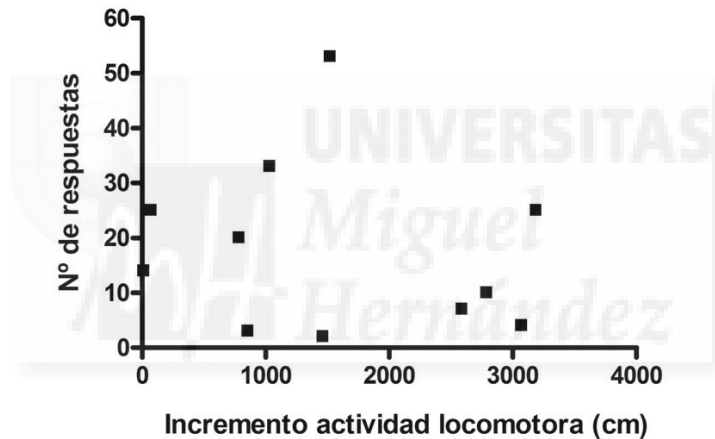
En la figura 10 se muestra la correlación entre los niveles de sensibilización motora y la motivación por la morfina, dada por el breaking point, de los animales de ambos genotipos. Estos datos se analizaron utilizando el GzLM, revelando únicamente interacción genotipo x sensibilización ( $\text{Wald}\chi^2(2)= 9,363$ ;  $p<0,01$ ). La descomposición de esta interacción mostró que el BP alcanzado por los animales sensibilizadores NK1<sup>-/-</sup> es significativamente menor que el alcanzado por los animales sensibilizadores silvestres ( $\Delta$   $p<0.05$  S NK1<sup>-/-</sup> vs. S NK1<sup>+/+</sup>), mientras que el BP conseguido por los animales no sensibilizadores NK1<sup>-/-</sup> es significativamente mayor que el de los NS NK1<sup>+/+</sup> ( $\Delta$   $p<0.05$  NS NK1<sup>-/-</sup> vs. NS NK1<sup>+/+</sup>). Además, esta descomposición reveló una diferencia estadísticamente significativa en el BP conseguido por los animales S NK1<sup>-/-</sup> comparado con los animales NS del mismo genotipo (\*\*  $p<0,01$  S NK1<sup>-/-</sup> vs. NS NK1<sup>-/-</sup>). Esta interacción muestra que mientras en los animales silvestres la motivación por la morfina es mayor en los S que en los NS, en los mutantes es al contrario, la motivación por la droga es superior en los NS que en los S.



**Figura 10. Motivación por morfina en animales sensibilizadores y no sensibilizadores NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M del BP alcanzado por los animales sensibilizadores (S) y no sensibilizadores (NS) de ambos genotipos. El análisis GzLM mostró que el BP alcanzado por los animales S NK1<sup>-/-</sup> fue significativamente menor comparado con el de los animales S NK1<sup>+/+</sup> y significativamente mayor para los animales NS NK1<sup>-/-</sup> comparado con los NS NK1<sup>+/+</sup> ( $\Delta$   $p<0.05$  vs. S

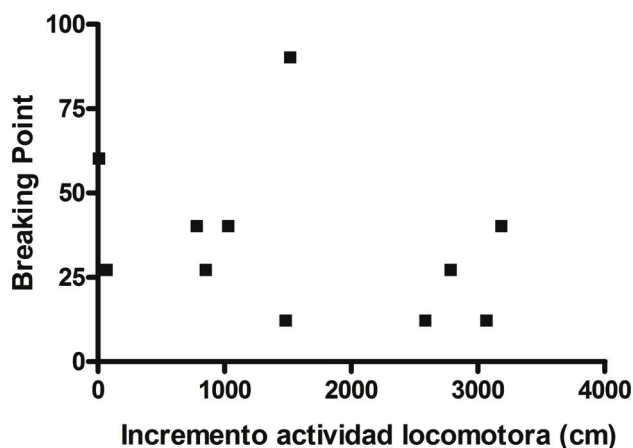
NK1+/+ y NS NK1+/+). Además, el BP conseguido por los animales S NK1-/- fue estadísticamente menor que el alcanzado por los animales NS del mismo genotipo (\*\*  $p < 0,01$  S NK1-/- vs. NS NK1-/-) ( $n=3-6/S$ ;  $n=2/NS$ ).

En este experimento también se estudió la posible correlación entre la expresión de la sensibilización motora inducida por morfina y la persistencia en la búsqueda de la droga en el período no droga (ND) (Fig. 11). Esta persistencia se evalúa contabilizando el número de veces en que el animal aprieta la palanca activa durante el período ND bajo un programa de autoadministración de razón progresiva. Se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). El coeficiente de correlación obtenido fue  $-0,1863$ , lo que nos indican que estas dos variables no están correlacionadas de manera significativa ( $p = 0,583$ ; NoS).



**Figura 11. Correlación sensibilización locomotora y búsqueda compulsiva de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-. Cada punto representa la correlación individual entre el incremento de actividad locomotora inducido por morfina y el número de respuestas en la palanca activa durante el período ND bajo un programa de razón progresiva ( $r$  de Pearson= $-0,1863$ ;  $p > 0,05$ ; NoS  $n = 11$ ).**

Se buscaron otras posibles correlaciones como la correlación entre las diferencias interindividuales en la expresión de la sensibilización motora inducida por morfina con la motivación por esta droga, dada por el BP (Fig. 12).



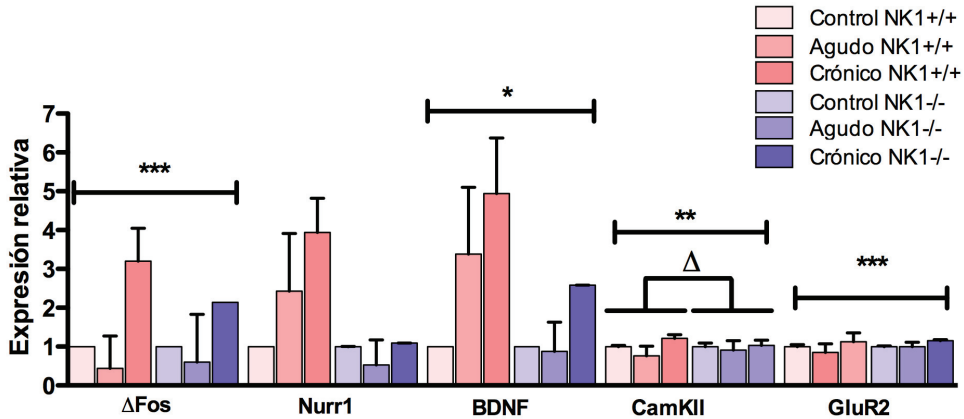
**Figura 12. Correlación sensibilización locomotora y motivación por la morfina en animales sensibilizadores y no sensibilizadores NK1+/+ y NK1-/-.** Cada punto representa la correlación individual entre el incremento de actividad locomotora inducido por morfina y el BP alcanzado en un programa de razón progresiva ( $r$  de Pearson=-0,3236;  $p>0,05$ ; NoS  $n= 11$ ).

## **8. Relación entre la sensibilización locomotora inducida por morfina y los cambios en la expresión génica en el núcleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal**

En este experimento quisimos analizar el efecto del tratamiento agudo y crónico con morfina sobre la expresión de genes implicados en la sensibilización a drogas de abuso y en la plasticidad sináptica ( $\Delta$ FosB, Nurr1, CaMKII, GluR2 y BDNF) en el núcleo accumbens (NAc), estriado (ST) y corteza prefrontal (CPF) de animales NK1+/+ y NK1-/. Considerando como efecto agudo el efecto de una única inyección de morfina (15 mg/Kg i.p.) , y crónico el efecto del tratamiento con la droga durante los 26 días del protocolo de sensibilización (2 inyecciones/día de 15 mg/ Kg de morfina i.p. durante 16 días y una inyección el día 26 del tratamiento) (ver apartado 4 de materiales y métodos).

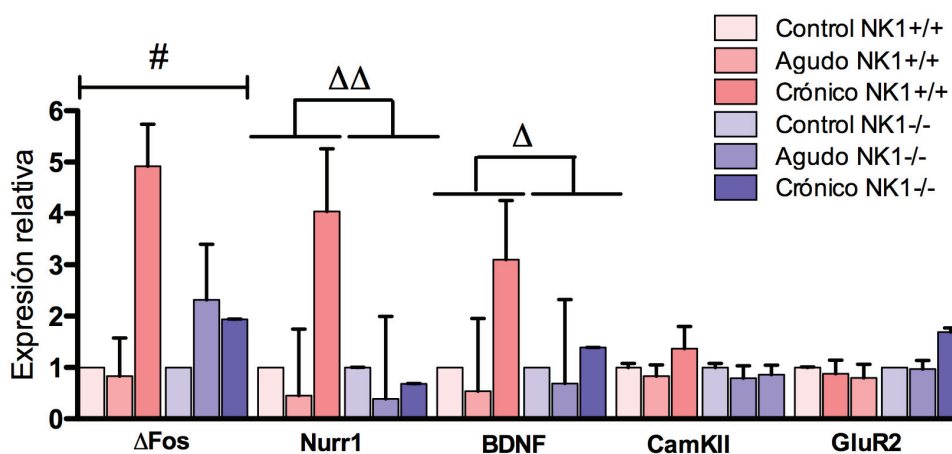
El análisis estadístico se realizó utilizando el GzLM para cada uno de los genes en las diferentes áreas cerebrales. En el caso del NAc el análisis de las RT-qPCR reveló efecto de tratamiento para  $\Delta$ FosB, CaMKII, GluR2 y BDNF (Wald  $\chi^2(2)= 17,722$   $p<0,001$ , Wald  $\chi^2(2)=$

11,054,  $p < 0,01$ , Wald  $\chi^2(2) = 16,073$   $p < 0,001$  y Wald  $\chi^2(2) = 6,450$ ,  $p < 0,05$  respectivamente), efecto de genotipo para CaMKII (Wald  $\chi^2(1) = 5,467$   $p < 0,05$ ) y, no se encontró interacción tratamiento x genotipo para ninguno de los genes evaluados (Fig. 13).



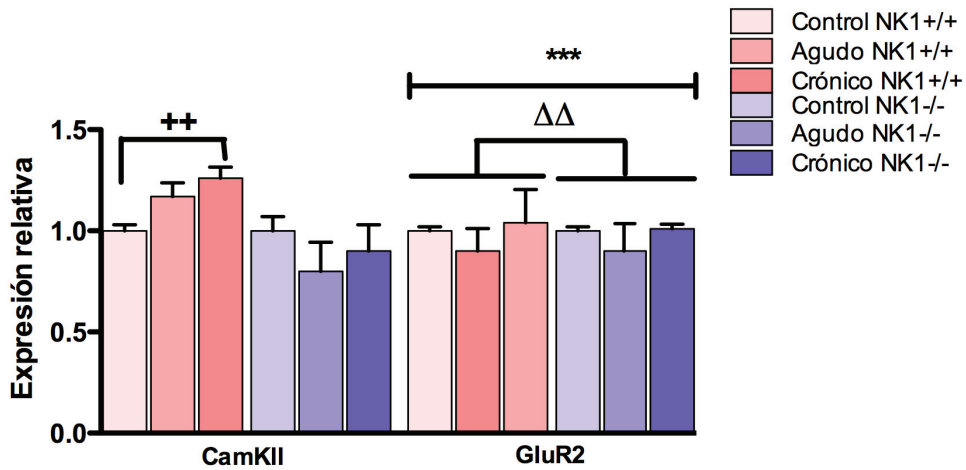
**Figura 13. Efecto del tratamiento con morfina sobre la expresión génica en el NAc.** Cada barra representa la media  $\pm$  SD de la expresión relativa de cada gen respecto a su respectivo control ( $n=3-7$ /grupo). El análisis GzLM reveló efecto de tratamiento para  $\Delta$ FosB, BDNF, CaMKII y GluR2 (\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ), de genotipo para CaMKII ( $\Delta$   $p < 0,05$  NK1-/- vs. NK1+/+) y sin embargo, no mostró interacción tratamiento x genotipo.

El GzLM en el estriado reveló efecto marginal de tratamiento para  $\Delta$ FosB (Wald  $\chi^2(2) = 5,718$   $p = 0,057$ ) y de genotipo para Nurr1 y BDNF (Wald  $\chi^2(1) = 11,437$   $p < 0,01$  y Wald  $\chi^2(1) = 4,992$ ,  $p < 0,05$  respectivamente) y no mostró interacción tratamiento x genotipo para ninguno de los genes evaluados (Fig.14).



**Figura 14. Efecto del tratamiento con morfina sobre la expresión génica en el estriado dorsal.** Cada barra representa la media  $\pm$  SD de la expresión relativa de cada gen respecto a su respectivo control ( $n=3-7$ /grupo). El análisis GzLM reveló efecto marginal de tratamiento para  $\Delta$ FosB ( $0,1 > p > 0,05$ ), de genotipo para Nurr1 y BDNF ( $\Delta$   $p < 0,05$ ;  $\Delta\Delta$   $p < 0,01$  NK1-/- vs. NK1+/+) y sin embargo, no mostró interacción tratamiento x genotipo.

El análisis estadístico en la corteza prefrontal reveló efecto de tratamiento (Wald  $\chi^2(2)=19,993$ ,  $p < 0,001$ ) y de genotipo (Wald  $\chi^2(1)=10,335$ ,  $p < 0,01$ ) para GluR2 e interacción tratamiento x genotipo para CaMKII (Wald  $\chi^2(2)=11,808$ ,  $p < 0,01$ ). La descomposición de la correspondiente interacción mostró un incremento en la expresión relativa de CamKII de los animales NK1+/+ tratados crónicamente con morfina comparado con su respectivo grupo control, mientras que en los animales NK1-/- no se observó dicho incremento (Fig.15).

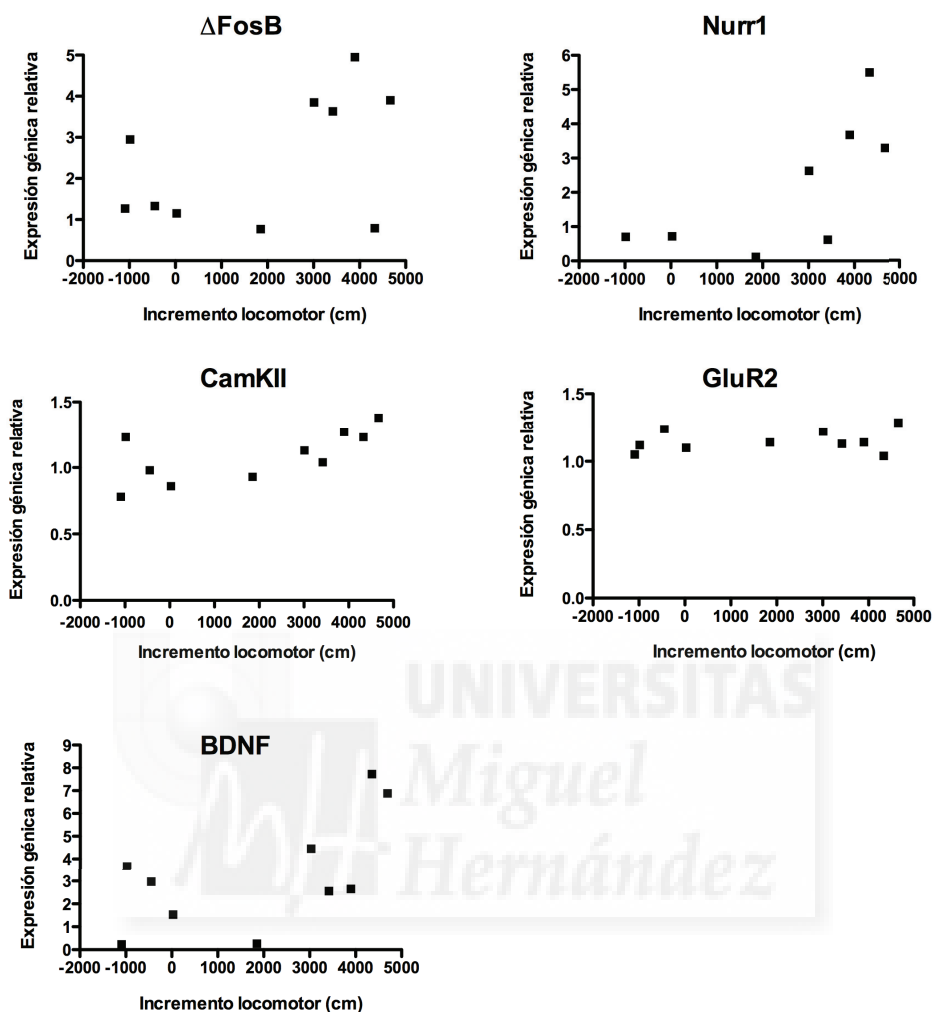


**Figura 15. Efecto del tratamiento con morfina sobre la expresión génica en la corteza prefrontal.**

Cada barra representa la media  $\pm$  SD de la expresión relativa de cada gen respecto a su respectivo control (n=3-7/grupo). El análisis GzLM reveló efecto de tratamiento (\*\* $p < 0,001$ ) y de genotipo ( $\Delta\Delta$   $p < 0,01$ ) para GluR2 e interacción tratamiento x genotipo para CaMKII. La descomposición de la interacción mostró un incremento en la expresión relativa de CamKII de los animales NK1+/+ tratados crónicamente con morfina comparado con su respectivo grupo control, mientras que en los animales NK1-/- no se observó dicho incremento (\*\*  $p < 0,01$  vs. control NK1+/+).

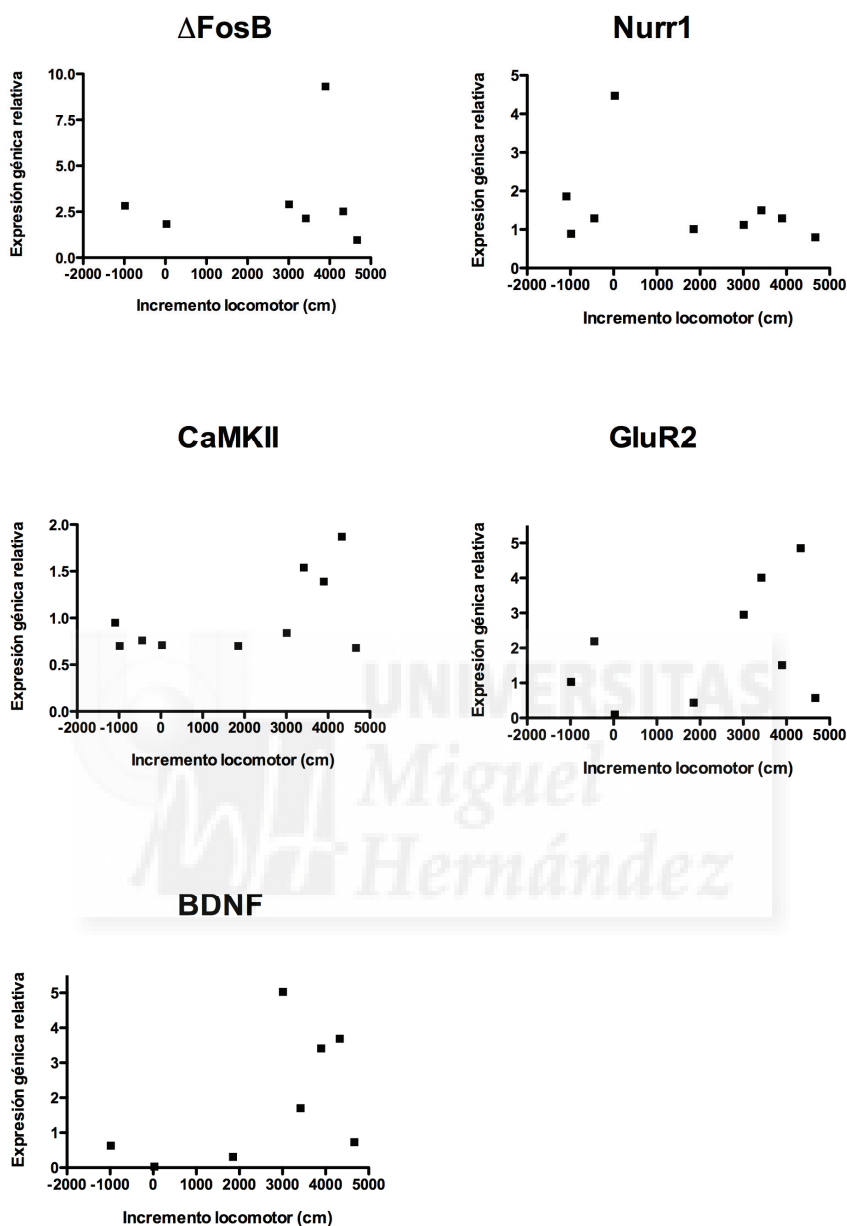
Se ha descrito que los genes  $\Delta$ FosB, Nurr1, CaMKII, GluR2 y BDNF están implicados en la sensibilización inducida por drogas y en la plasticidad sináptica consecuencia de la misma y, en este estudio quisimos correlacionar las diferencias interindividuales en la expresión de la sensibilización motora inducida por morfina con los cambios en la expresión génica relativa en distintas áreas cerebrales: NAc, ST y CPF (Figuras 16, 17 y 18).



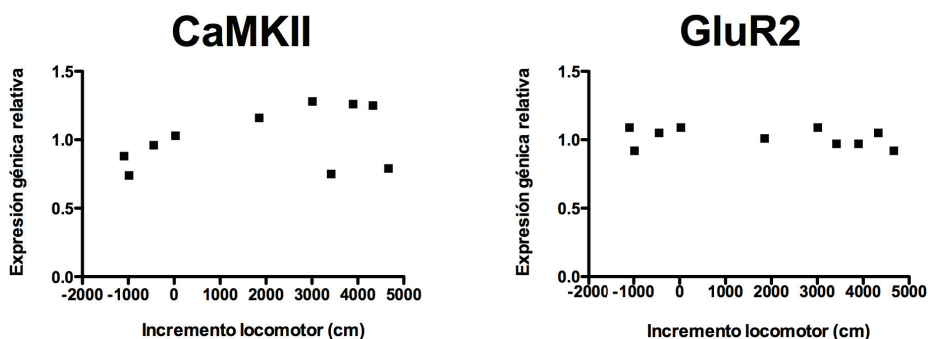


**Figura 16. Correlación entre sensibilización motora y cambios en la expresión génica en el NAc.**

Cada punto representa la correlación individual entre el incremento de actividad locomotora inducido por morfina en la fase de expresión de la sensibilización y la expresión génica relativa de 5 genes distintos:  $\Delta$ FosB, Nurr1, CaMKII, GluR2 y BDNF. El coeficiente de Pearson ( $r$ ) reveló existencia de correlación en el caso de CaMKII ( $r=0,6642$ ;  $p<0,05$   $n= 11$ ).



**Figura 17. Correlación entre sensibilización motora y cambios en la expresión génica en el estriado dorsal.** Cada punto representa la correlación individual entre el incremento de actividad locomotora inducido por morfina y la expresión génica relativa de 5 genes:  $\Delta$ FosB, Nurr1, CaMKII, GluR2 y BDNF. El coeficiente de Pearson no reveló correlación para ninguno de los genes estudiados ( $p > 0,05$  NoS;  $n = 11$ ).



**Figura 18. Correlación entre sensibilización motora y cambios en la expresión génica en la PCx.**

Cada punto representa la correlación individual entre el incremento de actividad locomotora inducido por morfina en la fase de expresión de la sensibilización y la expresión génica relativa de CaMKII y GluR2.

El coeficiente de Pearson no reveló correlación para ninguno de los dos genes ( $p > 0,05$  NoS;  $n = 11$ ).

La correlación entre el grado de sensibilización motora y la expresión génica relativa para cada animal de los diferentes genes se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ).

Los resultados obtenidos muestran que estas dos variables están correlacionadas de manera significativa ( $* p > 0,05$ ) únicamente en el caso de la expresión de CaMKII en el NAc (ver tabla III); es decir, a mayor sensibilización locomotora mayores niveles de expresión de CaMKII.

Además, el análisis estadístico detectó una significación marginal ( $\# 0,1 > p > 0,05$ ) en la correlación entre la sensibilización y los cambios en la expresión de Nurr1 y BDNF en el NAc.

**Tabla III. Coeficiente de correlación y significación ( $p$ ) para los distintos genes y áreas cerebrales**

	$\Delta$ FosB	Nurr1	CaMKII	GluR2	BDNF
<b>NAc</b>	0,4833	0,7046	0,6642	0,2380	0,6147
	$p > 0,05$	<b><math>p = 0,05\#</math></b>	<b><math>p &lt; 0,05*</math></b>	$p > 0,05$	<b><math>p = 0,05\#</math></b>
<b>ST</b>	0,1639	0,5325	0,5417	-0,3394	0,4200
	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>CPF</b>	–	–	0,3610	-0,3037	–
			$p > 0,05$	$p > 0,05$	



## DISCUSIÓN





## **1. Adquisición y expresión de la sensibilización locomotora inducida por cocaína y morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-**

En este trabajo, hemos estudiado la implicación de la SP en la adquisición y mantenimiento de la sensibilización locomotora inducida por dos drogas de abuso distintas, cocaína y morfina, en animales knockout para el receptor NK1 (NK1-/-). La administración repetida tanto de opiáceos como de drogas psicoestimulantes inducen un incremento gradual de sus propiedades psicomotoras y recompensantes. Esta respuesta se cree que es debida a la facilitación de la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el cerebro anterior, especialmente en las conexiones entre el área tegmental ventral (ATV), el núcleo accumbens (NAc) y el cortex prefrontal (CPF). Estos cambios se relacionan con aspectos motivacionales de la adicción como el deseo patológico por consumir la droga (“craving”) o el restablecimiento de la búsqueda compulsiva de la misma (Koob and Le Moal 1997; Vanderschuren et al. 1999).

En este trabajo, tanto la respuesta aguda a cocaína como la respuesta adaptativa a la administración repetida de esta droga produjeron un incremento locomotor similar en animales NK1+/+ y NK1-/. Estos resultados están en concordancia con trabajos previos, en los que mostraron una similar adquisición y expresión de la sensibilización locomotora inducida por cocaína en animales de ambos genotipos, aunque con ligeras discrepancias que describiremos a continuación (Ripley et al. 2002). De acuerdo a lo ampliamente descrito sobre la activación locomotora aguda inducida por cocaína en ratón (Tepper and Woods 1978; Thomsen and Caine 2011; Wiltshire et al. 2015), en nuestro trabajo observamos que efectivamente la administración aguda de esta droga produjo un incremento en la actividad locomotora de los animales silvestres, así como de los NK1-/. Sin embargo, en el estudio de Ripley no consiguieron inducir este efecto locomotor agudo. Además, cabe destacar que mientras en nuestro estudio se produjo un incremento gradual de la actividad locomotora a lo largo del tratamiento crónico con cocaína (Kotlinska et al. 2013; Robinson and Berridge 2000), estos autores no mostraron un aumento paulatino en la sensibilización locomotora, de hecho el día 7 del tratamiento crónico con droga los animales mostraron un nivel de sensibilización superior que el día 19 e incluso que el día 26. Una posible explicación para esta divergencia en los resultados puede ser el ambiente

empleado durante la adquisición y expresión de la sensibilización, ya que sabemos que la sensibilización es dependiente de contexto (Anagnostaras and Robinson 1996; Vezina et al. 1989). Parece posible que el contexto utilizado en el trabajo de Ripley fuera diferente a lo largo del tratamiento crónico con la droga, ya que si el ambiente utilizado es el mismo durante las distintas fases de la sensibilización, la respuesta locomotora debería ser más fuerte en la fase de expresión. En este mismo sentido, existen numerosos trabajos que apoyan el crítico papel de los estímulos asociados con la droga en la expresión de la sensibilización, pudiendo afectar significativamente la presencia o ausencia de estos estímulos a los resultados obtenidos (Vezina and Leyton 2009).

La administración crónica de morfina produjo una robusta adquisición y expresión de sensibilización locomotora en animales silvestres, mientras que los animales carentes del receptor NK1 no mostraron sensibilización motora hasta el día 19 del protocolo de administración crónica de la droga, siendo además mucho más débil en comparación con la de los animales NK1+/+. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ripley et al. (2002) aunque cabe resaltar algunos puntos; por ejemplo, en su estudio la administración aguda de morfina provocó una ligera disminución en la actividad locomotora de los animales NK1-/-, mientras que en los animales silvestres no produjo diferencias respecto a su respectivo grupo salino. En contraposición, en nuestro trabajo la administración aguda de morfina produjo un efecto estimulante en los animales silvestres y no tuvo efecto en los animales mutantes, observación ya publicada por Murtra et al. (2000) utilizando dosis similares a las empleadas en estos estudios. Ripley en su trabajo postuló dos posibles causas para explicar estas diferencias respecto a la publicación previa de Murtra: el procedimiento experimental y el background genético de los animales empleados. Sin embargo, estas explicaciones no son válidas para explicar las diferencias respecto a nuestros resultados, ya que el procedimiento experimental utilizado fue el mismo y el background genético de los animales también (NK1 MF1).

Con todo esto podemos concluir que el receptor NK1 es necesario para que se manifiesten no sólo los efectos locomotores agudos de la morfina sino también para que se produzca la respuesta adaptativa a la administración crónica de esta droga que subyace al desarrollo de la sensibilización.



Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en el paradigma de preferencia de plaza condicionada a morfina donde se observó que las propiedades recompensantes de esta droga estaban ausentes en los animales NK1-/- (Murtra et al. 2000) y, con los obtenidos en experimentos de autoadministración en los cuales los animales knockout para el receptor NK1 mostraron incapacidad para autoadministrarse morfina (Ripley et al. 2002). Sin embargo, mientras que la recompensa, abstinencia y diversos comportamientos relacionados con la adicción a morfina están alterados en los animales NK1-/-, todos los comportamientos evaluados relacionados con las propiedades motivacionales y la adicción a la otra droga estudiada están intactos en los animales NK1-/- (Murtra et al. 2000; Ripley et al. 2002). Estas observaciones sugieren la disociación de los efectos comportamentales del receptor NK1 entre opiáceos y psicoestimulantes, lo cual puede deberse a que los efectos recompensantes de la cocaína pueden estar mediados por mecanismos parcialmente distintos a los implicados en la recompensa opiácea (Koob and Le Moal 1997; Robbins and Everitt 1999; Wise 1996); por ejemplo, los opiáceos, en contraposición a los psicoestimulantes, adicionalmente alcanzan sus efectos recompensantes a través del hipocampo dorsal e hipotálamo lateral.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos en los ratones carentes del receptor NK1 son similares a los obtenidos en los ratones knockout para el receptor cannabinoide CB1 (CB1-/-). De forma equivalente a lo que ocurre en los animales NK1-/-, los animales CB1-/- no muestran ni preferencia de plaza condicionada ni sensibilización inducida por morfina, no se autoadministran esta droga y presentan reducida la respuesta física a la abstinencia morfinica (Ledent et al. 1999; Martin et al. 2000). Sin embargo, al igual que en los animales NK1-/- las propiedades recompensantes de la cocaína y la sensibilización inducida por esta droga están inalteradas en los animales CB1-/- (Martin et al. 2000). Los opioides y los cannabinoides comparten numerosos efectos farmacológicos como la analgesia y la estimulación de los circuitos cerebrales de recompensa. Se ha demostrado la interacción funcional entre los sistemas opioide y cannabinoide (Manzanares, Corchero, Fuentes 1999), ya que la administración de THC induce modificaciones en ambos sistemas tales como el aumento de la expresión génica de la proopiomelanocortina, la prodinorfina y la proencefalina (Corchero, Fuentes, Manzanares 1997; Corchero et al. 1997). Además, las neuronas que coexpresan estos receptores se localizan en áreas del cerebro asociadas

con la motivación, como el sistema límbico y la sustancia gris periacueductal (Martin et al. 2000). Se ha demostrado el papel del sistema cannabinoide en la dependencia, motivación y propiedades recompensantes de los opioides, probándose que el antagonista del receptor CB1, SR141716A, precipita la abstinencia en ratas morfina dependientes (Navarro et al. 1998), disminuye la autoadministración de opioides y el CPP inducido por éstos (Navarro et al. 2001). Recíprocamente, se ha demostrado la implicación del sistema opioide en la dependencia a cannabinoides ya que existen trabajos que prueban que la administración en ratas tolerantes a THC del antagonista del receptor  $\mu$ -opioide, naloxona, precipita el síndrome de abstinencia (Navarro et al. 1998). Esto sugiere la necesidad de cooperación entre los receptores cannabinoides y opioides para que se exprese la dependencia a los cannabinoides.

## **2. Vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina y cocaína. Implicación de la SP**

Una cuestión altamente intrigante en el campo de la adicción es por qué sólo algunas personas se vuelven adictas y qué factores hacen a estas personas más vulnerables a la adicción. Como hemos comentado en la introducción de este capítulo, existen distintos factores que influyen en la transición del uso recreativo de una droga al desarrollo de una conducta adictiva y, por este motivo se han analizado posibles factores de vulnerabilidad a la adicción: factores genéticos (Crabbe et al. 1999; Ellenbroek et al. 2005; Uhl 2004b), ambientales (Goeders 2002; Piazza and Le Moal 1996), y neurobiológicos (Goldstein and Volkow 2002).

En este trabajo hemos propuesto la propensión a la sensibilización locomotora como factor de vulnerabilidad a la adicción a drogas; este proceso, como reflejo de la sobreexpresión de algunos parámetros neuronales, ha sido sugerido como requerimiento para la progresión e instauración de la conducta adictiva (Phillips and Fibiger 1990; Robinson and Berridge 1993; Robinson and Berridge 2000; Wolf 1998). La mayor parte de los trabajos que se han llevado a cabo en este campo han estudiado la sensibilización a drogas y sus consecuencias funcionales y estructurales a nivel cerebral (Corbille et al. 2007; Guegan et

al. 2015; Souza-Formigoni et al. 1999). Sin embargo, muy pocos trabajos han considerado el fenómeno de la sensibilización como un factor de vulnerabilidad, estudiando las diferencias interindividuales en la propensión a sensibilizar (Camarini and Hodge 2004; Legastelois et al. 2014) y las consecuencias que la sensibilización pudiera tener en el establecimiento de un patrón conductual adictivo. Un ejemplo, es el trabajo publicado por Legastelois, en el que han intentado descifrar la relación entre la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por etanol (EtOH) y la dependencia al alcohol. En esta misma dirección, nosotros hemos querido estudiar la propensión a la sensibilización locomotora como posible factor de vulnerabilidad a la adicción a drogas y la existencia o no de modulación SPérgica: seleccionando y comparando a los animales que sensibilizan con aquellos que, a pesar de recibir la misma dosis de droga y durante el mismo tiempo, no desarrollan sensibilización.

Por otro lado, la vulnerabilidad a desarrollar sensibilización psicomotora inducida por drogas varía entre especies, cepas e individuos (Abrahamo, Quadros, Souza-Formigoni 2009; Botia et al. 2012; Piazza et al. 1991; Quadros et al. 2002a; Quadros et al. 2002b). Así, las líneas criadas selectivamente se han convertido en un modelo muy utilizado para estudiar las diferencias individuales en la vulnerabilidad en el desarrollo de la adicción y, para descubrir los mecanismos neurobiológicos que subyacen a estas diferencias (Ranaldi et al. 2001). La mayoría de los estudios enfocados a relacionar la sensibilización locomotora inducida por drogas con comportamientos que caracterizan la adicción o con los cambios neurobiológicos que subyacen a ella han utilizado cepas de ratón consanguíneas (inbred) como C57BL/6J o DBA/2J (Belknap, Crabbe, Young 1993; Camarini and Hodge 2004; Guegan et al. 2015; PHillips et al. 1994; PHillips, Dickinson, Burkhart-Kasch 1994). Sin embargo, en nuestro estudio hemos querido utilizar una cepa de ratones exogámica (outbred) NK1 MF1, lo cual se puede considerar como una herramienta útil en el entendimiento de la variabilidad interindividual, debido a que las cepas exhiben una mayor heterogeneidad genotípica y fenotípica que podría ser más comparable a una población heterogénea como la humana (Rice and O'Brien 1980).

Debido a la variabilidad individual a la susceptibilidad a sensibilizar, algunos ratones muestran un importante incremento en la actividad locomotora tras la inyección repetida de

una droga (sensibilizadores), mientras que otros (resistentes o no sensibilizadores) no muestran importantes signos de sensibilización. Sin embargo, los criterios para realizar esta clasificación difieren entre autores. Existen autores que han basado los criterios de clasificación de la sensibilización en el coeficiente de varianza (CV) del ratio entre el último y el primer día de tratamiento en el grupo salino ( $CV = \text{desviación estándar}/\text{media}$ ), lo que proporciona una medida de la variabilidad dentro del grupo salino (Boudreau and Wolf 2005). De esta forma un animal es considerado sensibilizador si su incremento en la actividad locomotora a lo largo del tratamiento con la droga excede el CV del grupo salino. Sin embargo, aplicando este criterio en nuestros experimentos no seríamos capaces de discriminar entre los animales sensibilizadores y los resistentes ya que todos ellos, independientemente del genotipo, serían considerados sensibilizadores. En contraposición, nuestro criterio para separar la población de ratones en sensibilizadores o no sensibilizadores, está basado en la variabilidad intrasujeto sin considerar en este caso el comportamiento de los grupos en conjunto: tratados con salino, droga o los diferentes genotipos; es decir, cada individuo ha sido comparado únicamente con él mismo. De esta forma, hemos considerado como sensibilizadores aquellos individuos que en la fase de expresión o mantenimiento de la sensibilización (día 26) muestran un incremento de más de 1000 cm de distancia locomotora respecto al primer día de tratamiento con morfina (día 4) y, como no sensibilizadores a aquellos en los que los efectos hiperlocomotores inducidos por la morfina entre estos días resultan en un incremento menor de 100 cm. Estos criterios nos han permitido diferenciar la susceptibilidad a desarrollar sensibilización locomotora inducida por drogas, dentro de una población heterogénea de animales, en función de la variabilidad de cada individuo respecto a sí mismo, sin tener en cuenta el incremento en la actividad de cada individuo respecto su respectivo grupo salino.

En lo que respecta a la implicación SPérgica en la vulnerabilidad a la sensibilización, este estudio revela que los ratones sin el gen NK1 desarrollan en menor proporción sensibilización locomotora inducida por morfina (19,1%) comparado con animales silvestres (76,5%). Siendo además, el incremento locomotor debido a la sensibilización significativamente menor en los animales sensibilizadores NK1<sup>-/-</sup> que en los sensibilizadores NK1<sup>+/+</sup>. Sin embargo, el porcentaje de animales sensibilizadores a cocaína es similar en ambos genotipos. Estos resultados apoyan la implicación del receptor

NK1 en la manifestación de la respuesta adaptativa inducida por la administración crónica de morfina, aunque no de cocaína, que subyace al desarrollo de la sensibilización.

### **3. Autoadministración de recompensantes naturales y relación con la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina**

La autoadministración operante de recompensantes naturales, como la comida, no está alterada en los animales NK1-/- para ninguno de los programas de refuerzo utilizados en nuestros experimentos (FR1, FR3 y PR). Por tanto, los animales carentes del receptor NK1 son capaces de aprender un comportamiento operante como es apretar una palanca, descartando posibles alteraciones en el aprendizaje y la memoria, por lo que el receptor NK1 no modula la adquisición y mantenimiento de este comportamiento en respuesta a recompensantes naturales. Ripley et al. (2002) también demostraron la capacidad para adquirir el comportamiento operante para obtener comida de los animales knockout para el receptor NK1, utilizando ratones de la misma cepa que en nuestros experimentos (MF1). Por otra parte, la motivación por estos refuerzos naturales (reflejada por el BP alcanzado) permanece inalterada en los animales NK1-/-, siendo capaces de trabajar tanto como los silvestres para obtener un pellet de comida. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en el paradigma de preferencia de plaza condicionada a comida donde se observó que las propiedades recompensantes de este reforzante natural estaban intactas en los animales NK1-/-, mostrando además que los animales NK1-/- no presentaban deficiencias en el aprendizaje hacia estímulos positivos (Murtra et al. 2000).

El circuito mesocorticolímbico regula el refuerzo producido tanto por los recompensantes naturales como por las drogas de abuso (Hyman, Malenka, Nestler 2006) y además, ambos tipos de refuerzos implican mecanismo celulares y moleculares similares (Pitchers et al. 2013). Debido a esto, el consumo repetido de drogas induce neuroadaptaciones en los circuitos neuronales de recompensa implicados en la regulación de la motivación lo que puede conducir a un procesamiento anormal de la información en estos sistemas y finalmente, puede llevar a comportamientos anómalos relacionados con el refuerzo (Kelley and Berridge 2002). De hecho, muchos consumidores de drogas a menudo informan sobre

la incapacidad de experimentar placer en respuesta a estímulos generalmente reforzantes (anhedonia), lo cual ha sido implicado en la transición hacia la adicción (D'Souza and Markou 2010). Existen trabajos publicados en los que se ha informado sobre cómo la exposición crónica de ratas a cocaína afecta la adquisición de refuerzos apetitivos naturales como la autoadministración de una solución de sacarosa al 10% o montar a una hembra receptiva, reduciéndose la adquisición de ambos refuerzos cuando se elevan los requerimientos de la respuesta (Barnea-Ygael, Gal, Zangen 2014). Sin embargo, en nuestro estudio las neuroadaptaciones que subyacen a la exposición repetida a morfina no son capaces de alterar la adquisición de la conducta operante de obtención de un recompensante natural (comida), asumiendo que las propiedades reforzantes del mismo se mantienen inalteradas y descartando la relación entre la vulnerabilidad a la sensibilización inducida por morfina y la regulación de la motivación por la comida, ya que animales sensibilizadores y no sensibilizadores a la droga muestran similar motivación por este refuerzo natural.

#### **4. Autoadministración de morfina en animales NK1+/+ y NK1-/-**

En el presente trabajo no hemos logrado confirmar la importancia del receptor NK1 en la adquisición y mantenimiento de la autoadministración a morfina, ya que: 1) el tiempo necesario para alcanzar los criterios de adquisición de un comportamieto operante de autoadmistración de morfina no fue significativamente diferente entre genotipos, 2) el número de respuestas sobre la palanca activa tampoco difiere para ninguno de los programas de autoadministración, y 3) la cantidad de trabajo realizado para obtener una infusión de morfina no fue significativamente distinta en los animales carentes del receptor NK1. Resultados contrapuestos fueron publicados por Ripley en un trabajo previo donde probaron la falta de motivación en los animales NK1-/- en la búsqueda de morfina, ya que los animales knockout no fueron capaces de adquirir un comportamiento operante de autoadministración intravenosa de esta droga (Ripley et al. 2002). La discrepancia en los resultados obtenidos puede deberse a las diferencias en el protocolo de autoadministración de morfina utilizado, ya que estos autores realizaron un total de 11 sesiones (1 sesión/día) de autoadministración de morfina de 90 min de duración cada una y todas ellas bajo un

programa de razón fija 2 (FR2). Nuestro protocolo de autoadministración fue mucho más complicado, ya que las 2 horas de duración de cada sesión estaban divididas en periodos donde la droga estaba disponible (D) y en los que no lo estaba (ND) y además, los requerimientos para obtener una infusión de droga aumentaban a medida que los individuos superaban los criterios de estabilidad establecidos y, solamente aquellos individuos que adquirían los criterios de autoadministración pasaban a un programa de razón superior. Sin embargo, tanto la dosis de morfina utilizada (0,2 mg/kg/infusión) como el background genético de los animales empleados fueron los mismos en ambos casos (NK1 MF1). Ripley en su trabajo ya informó acerca de que las diferencias encontradas entre genotipos eran sutiles, ya que inicialmente el número de infusiones autoadministradas de morfina era el mismo en NK1<sup>-/-</sup> y NK1<sup>+/+</sup>, y únicamente a partir de la séptima sesión el número de refuerzos obtenidos comenzó a ser superior en los animales silvestres que en los mutantes; encontrando efecto de genotipo y de los días pero no interacción genotipo x día. De esta misma forma, el análisis del número de respuestas sobre la palanca activa e inactiva no reveló diferencias significativas entre genotipos durante los primeros días de autoadministración y, únicamente en las dos últimas sesiones de autoadministración los animales silvestres alcanzaron un número de respuestas superior en la palanca activa comparado con la palanca inactiva, no observándose este efecto en animales NK1<sup>-/-</sup>. Si a todo lo comentado anteriormente, añadimos que la n experimental fue de 4 animales knockout y 5 animales silvestres confirmamos que las diferencias observadas por Ripley fueron sutiles. En nuestro trabajo, con un número de animales entre 20 y 24 por grupo, hemos observado que tanto NK1<sup>+/+</sup> como NK1<sup>-/-</sup> son capaces de adquirir y mantener un comportamiento de autoadministración operante de morfina, siendo capaces de discriminar con la misma avidez entre la palanca que proporcionaba refuerzo y la palanca sin consecuencias, incluso cuando elevamos los requerimientos en la respuesta. Además, nosotros quisimos evaluar la motivación de los animales de ambos genotipos por la morfina; para ello evaluamos la cantidad de esfuerzo que eran capaces de hacer para obtener una infusión de esta droga, dado por el punto de corte obtenido o BP, en un programa de autoadministración de razón progresiva (PR). Aunque cualitativamente parece que pudiera existir una menor motivación por la droga en los animales NK1<sup>-/-</sup>, los resultados obtenidos revelaron que no existen diferencias estadísticamente significativas en

la motivación por la morfina.

## **5. Correlación entre la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina y el desarrollo de la adicción**

La selección fenotípica realizada en este trabajo, basada en las diferencias individuales en la susceptibilidad a sensibilizar, pone de manifiesto la existencia de individuos que sensibilizan rápidamente y de otros más resistentes. Nuestra hipótesis es que los primeros serían los individuos más propensos al desarrollo y persistencia de una conducta adictiva. Con el fin de probar nuestra hipótesis correlacionamos la vulnerabilidad a desarrollar sensibilización locomotora inducida por el tratamiento crónico con morfina con la motivación por conseguir esta droga. Según nuestro planteamiento, cabría esperar que aquellos individuos que han desarrollado mayor sensibilización serían los que tendrían un mayor deseo o motivación por la droga. En este sentido, trabajos previos han mostrado en ratones que la pre-exposición crónica a elevados niveles de etanol incrementa el posterior consumo del mismo (Becker and Lopez 2004). Sin embargo, nuestro estudio no ha revelado relación alguna entre estas variables, de forma que tanto los animales sensibilizadores como los resistentes a la sensibilización morfinica son capaces de realizar el mismo trabajo para obtener la droga, mostrando por tanto similar motivación por ella. Por otra parte, en este estudio hemos observado que la motivación por la morfina en los animales sensibilizadores a la droga carentes del receptor NK1 es estadísticamente menor que la de los animales sensibilizadores silvestres; esto tiene sentido ya que como hemos dicho anteriormente las propiedades recompensantes de la morfina se encuentran disminuídas en el mutante (Murtra et al. 2000) y por tanto, es lógico que las menores propiedades motivacionales que ejerce la morfina sobre los animales NK1-/- conlleven a que se esfuercen menos en obtenerla.

Otro de los criterios diagnósticos utilizados para discriminar entre la mera autoadministración de la droga y el patrón de búsqueda compulsiva de la misma que caracteriza la adicción fue la evaluación de la persistencia del animal en la búsqueda de morfina aún cuando sabe que la droga no está disponible. La subsecuente correlación entre



la propensión a desarrollar sensibilización locomotora inducida por el tratamiento crónico con morfina y este criterio de adicción mostró que estas variables no presentaban conexión. En conclusión, la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora no predispone al desarrollo de un patrón de conducta adictiva de drogas, al menos en las condiciones experimentales empleadas en nuestro estudio.

Trabajos previos, si han sido capaces de apuntar hacia posibles factores de vulnerabilidad a la adicción. Por ejemplo, Jodogne et al., (Jodogne et al. 1994) pusieron de manifiesto la importancia de las diferencias interindividuales en la reactividad locomotora ante un ambiente novedoso con la propensión a desarrollar un comportamiento de autoadministración de psicoestimulantes.

Además, otros autores han conseguido demostrar la relevancia funcional de la sensibilización de los efectos de la estimulación motora que induce el tratamiento crónico con etanol, demostrando en ratones que la sensibilización locomotora inducida por etanol incrementa la subsecuente autoadministración de la droga (Camarini and Hodge 2004; Lessov et al. 2001).

## **6. Cambios en las expresión génica en el núcleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal inducidos por morfina**

En el presente estudio hemos sido capaces de demostrar que la sensibilización a morfina induce cambios en la expresión de diferentes genes en áreas cerebrales implicadas en la recompensa y la motivación: NAc, ST y CPF.

Uno de los genes de expresión temprana estudiados fue  $\Delta$ FosB (forma truncada de FosB) cuya expresión por la administración aguda de drogas de abuso es baja y sin embargo, se acumula en el NAc, estriado dorsal y corteza prefrontal tras la exposición crónica tanto a drogas (morfina,  $\Delta$ 9-THC, cocaína y etanol) como a recompensantes naturales (McClung and Nestler 2003; Nestler, Kelz, Chen 1999; Nestler 2004). Otra característica que lo hace particularmente interesante es que su expresión, a pesar de ser un gen de expresión temprana, permanece elevada tras largos períodos de tiempo desde el cese de la droga (Renthal and Nestler 2009). Nuestros resultados, tal y como

cabía esperar, muestran que el tratamiento agudo con morfina no indujo acumulación de  $\Delta$ FosB en estriado dorsal y ventral de los animales NK1+/+, mientras que el tratamiento crónico con la droga indujo sobreexpresión de  $\Delta$ FosB en ambas áreas, siendo su expresión muy notable en el estriado dorsal. Esto concuerda con la premisa basada en que los cambios plásticos a largo plazo inducidos por el tratamiento con opiáceos o psicoestimulantes están unidos a la expresión de genes de expresión temprana, particularmente  $\Delta$ Fos-B en el NAc (Nye and Nestler 1996). Nuestros resultados coinciden con trabajos previos en los que se ha demostrado que el tratamiento crónico con morfina induce una elevada acumulación de  $\Delta$ FosB en el estriado dorsal y más discreta en el ventral (Perrotti et al. 2008). Si analizamos los resultados obtenidos en los NK1-/- vemos que estadísticamente no difieren de los obtenidos en los silvestres. Murtra et al. (2000) ya examinaron mediante fluorescencia la expresión de  $\Delta$ FosB en las neuronas del núcleo accumbens tras el tratamiento crónico con morfina, no encontrando diferencias significativas entre genotipos en el número total de neuronas  $\Delta$ FosB positivas. Sin embargo observaron, en los animales NK1+/+ pero no en los NK1-/-, un notable incremento en la intensidad de la fluorescencia de las neuronas  $\Delta$ FosB positivas del NAc respecto al grupo control tratado con salino. Nosotros analizamos la expresión de  $\Delta$ FosB en el NAc mediante RT-qPCR tras el tratamiento crónico con morfina y los resultados obtenidos son similares a los publicados por Murtra, ya que en nuestro estudio tampoco encontramos diferencias significativas entre genotipos en la expresión de este gen tras el tratamiento crónico con la droga en el NAc, aunque si observamos un efecto marginal de genotipo en el estriado, dado en gran media por la mayor sobreexpresión de  $\Delta$ FosB inducida por el tratamiento crónico con la droga respecto a su respectivo control en los animales NK1+/+. Estos resultados apoyan la idea que la activación de  $\Delta$ FosB está unida a la expresión de la recompensa opiácea (Nye and Nestler 1996), ausente en los animales NK1-/- (Murtra et al. 2000).

Otro de los IEGs estudiados en este trabajo fue Nurr1 que codifica receptores huérfanos que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, pero no poseen ligandos actuando como un factor de transcripción inducible. En condiciones

basales Nurr1 se expresa en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) y el área tegmental ventral (ATV) (Zetterstrom et al. 1996), siendo esencial su expresión tanto durante el desarrollo embrionario de estas neuronas como en su mantenimiento en el adulto (Kadkhodaei et al. 2009; Zetterstrom et al. 1996). Su expresión es inducida de forma rápida y transitoria por numerosos tipos de estímulo, especialmente interesante para nosotros resulta el hecho de que las drogas de abuso y el estrés inducen su expresión en el circuito de recompensa y motivación cerebral, desempeñando un papel clave en las bases moleculares que subyacen a la disregulación a largo plazo en estos circuitos neuronales. En nuestro estudio no hemos observado alteraciones estadísticamente significativas en la expresión de Nurr1 debido al tratamiento con morfina aunque si detectamos un efecto de genotipo que nos indica que sus niveles de expresión difieren entre animales NK1+/+ y NK1-/. Estas diferencias entre genotipos podrían explicarse uniendo dos premisas: la primera consiste en que, como mostraremos en el capítulo II de este trabajo, en condiciones fisiológicas los niveles estriatales de DA difieren entre animales NK1+/+ y NK1-/- y, la segunda es que se ha demostrado que tanto los niveles de DA extracelular como la señalización dopaminérgica influyen en la expresión de Nurr1 de diferentes áreas del circuito de recompensa (Bannon et al. 2002; Bannon et al. 2004). Por lo que podríamos hipotetizar que las diferencias en la concentración estriatal de DA entre genotipos, conllevarían a distinta modulación de la transmisión dopaminérgica, conduciendo a diferencias en la expresión de este factor de transcripción. En este sentido se ha demostrado que los ratones carentes del receptor D2 sobreexpresan Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Tseng et al. 2000) y, que la pérdida estriatal de DA inducida por la 6-OHDA incrementa la expresión de Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas de la SN (Ojeda et al. 2003). Por otra parte, sabemos que el receptor NK1 y el receptor D2 colocalizan en las grandes interneuronas colinérgicas del núcleo acumbens (Aubry et al. 1994; Gerfen 1991) (que tónicamente modulan la excitabilidad de las eferencias neostriatales), siendo su expresión esencial para el desarrollo de los efectos de la recompensa opiácea (Maldonado et al. 1997). Como hemos dicho anteriormente, se ha demostrado que la señalización dopaminérgica, especialmente a través de los receptores D2, influye en la expresión de Nurr1 de

diferentes áreas del circuito de recompensa, por lo que podríamos pensar que de igual modo la SP a través de su receptor NK1 podría modular la expresión de Nurr1, explicando las diferencias de expresión entre genotipos de este factor de transcripción en el estriado dorsal y ventral. A pesar de no encontrar significación, gráficamente si observamos que el tratamiento crónico con morfina induce, tanto en el NAc como en el estriado, una sobreexpresión de Nurr1 en los animales silvestres que no se produce en los mutantes. Resultados previos han mostrado que la administración aguda y crónica de psicoestimulantes induce alteraciones en los niveles de Nurr1 de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas, sugiriendo así la mediación de este factor de transcripción en los procesos neuroadaptativos de los circuitos dopaminérgicos (Krasnova et al. 2011; Leo et al. 2007). En concordancia con nuestros resultados, trabajos previos han demostrado en ratas que la administración crónica de morfina induce una sobreexpresión de Nurr1 en el ATV, indicando además la existencia de correlación entre la expresión de Nurr1 y la neuroplasticidad dopaminérgica durante la adicción opiácea en la vía mesolímbica (García-Pérez et al. 2016). Además, este incremento en la expresión estriatal de Nurr1 se ha demostrado con la administración crónica de otras drogas como nicotina, amfetamina o la combinación de ambas (Saint-Preux et al. 2013).

La inducción de  $\Delta$ FosB altera la expresión de genes de inducción tardía como CaMKII, GluR2, BDNF los cuales son fundamentales en los procesos de plasticidad sináptica (Robinson and Kolb 2004). Dentro de las quinasas calcio/calmodulina dependientes, la CaMKII es particularmente abundante en el cerebro, siendo además la isoforma  $\alpha$  la predominante en el cerebro de rata (Sola, Tusell, Serratosa 1999). Diversos trabajos han demostrado que la CaMKII es un componente clave en las vías moleculares que subyacen a la adicción a drogas (Fan et al. 1999; Li, Mao, Wei 2008). De hecho, estudios utilizando modelos animales de drogadicción han demostrado que cambios en los niveles de actividad o de expresión de la CaMKII influyen en la respuesta de los animales a las drogas de abuso y, al contrario, que la exposición a drogas produce cambios en la expresión o actividad de la CaMKII en determinadas áreas cerebrales. Por ejemplo, la inyección en el hipocampo y en la amígdala del inhibidor de CaMKII, KN-62, suprime la adquisición de CPP inducida por morfina (Lu et al. 2000), indicando

la importancia de la CaMKII cerebral en la adicción opiácea. Nosotros hemos estudiado el papel de la sensibilización motora a morfina en la inducción de los niveles de expresión de CaMKII en diferentes áreas cerebrales; en el NAc se observó que el tratamiento con la droga modifica los niveles de expresión de este gen y que además, estos niveles difieren entre genotipos pero más interesante resultó lo observado en la CPF donde el tratamiento inducido por morfina produce una sobreexpresión de CaMKII en los animales NK1+/+ que no se observa en los animales NK1-/. En nuestro trabajo hemos logrado demostrar la relación entre la sensibilización motora inducida por drogas y los cambios en la expresión de CaMKII, lo cual correlaciona con trabajos previos en los que se ha demostrado que la administración directa en el ATV del inhibidor de la CaMKII, KN-93, atenúa la sensibilización comportamental inducida por cocaína y que los ratones carentes de la isoforma  $\alpha$  de la CaMKII presentan reducida la sensibilización motora inducida por esta droga (Licata, Schmidt, Pierce 2004), sugiriendo que el incremento en el flujo de calcio en las neuronas dopaminérgicas del ATV contribuyen a la sensibilización comportamental por amplificación de la señalización a través de la CaMKII. Los cambios a nivel molecular observados en nuestro estudio podrían subyacer a las neuroadaptaciones inducidas por el tratamiento crónico y observadas fenotípicamente en la expresión de la sensibilización locomotora, estando ambas mediadas por el receptor NK1. Sabemos que el consumo crónico de drogas de abuso produce alteraciones en la expresión de ciertos genes implicados en plasticidad. Por ejemplo, la exposición crónica a cocaína incrementa la expresión de CaMKII que fosforila a la histona deacetilasa, aumentando la acetilación de ciertas histonas en los promotores de determinados genes diana como el gen que codifica para el receptor NK1, el Cdk5 y el BDNF (Hyman, Malenka, Nestler 2006; Renthal and Nestler 2009). Este hecho podría sugerir una relación entre el receptor NK1, implicado en la potenciación a largo plazo (LTP) y en la adicción que es una forma de aprendizaje asociativo y las neuronas que lo expresan responden a estímulos que disparan a una tarea aprendida y recompensante (Boix et al. 1995; Elliott and Iversen 1986), y la CaMKII lo que podría llevar a una especie de retroalimentación positiva que potenciara sus efectos y por eso no observamos la sobreexpresión de CaMKII inducida por morfina en los animales carentes del receptor

NK1 (NK1<sup>-/-</sup>). Es decir, se ha demostrado que el tratamiento crónico con drogas de abuso induce la sobreexpresión de CaMKII la cual modula la expresión del gen NK1, pero a su vez la expresión de este gen es condición necesaria para que se produzca dicha sobreexpresión.

Además de la clara implicación del sistema dopaminérgico en el desarrollo de la sensibilización comportamental a los psicoestimulantes y opiáceos (Zarrindast and Rezayof 2004), este proceso puede reflejar cambios plásticos que implican la regulación del receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (receptor AMPA) (Wolf 1998). Los receptores AMPA están implicados en la neurotransmisión excitatoria rápida del glutamato y en procesos fisiológicos como plasticidad sináptica y formación de sinapsis y, cuya sobreexpresión conlleva a desordenes neurológicos como el Alzheimer y la epilepsia (Palmer, Cotton, Henley 2005). Los receptores AMPA son complejos heteroméricos formados por 4 subunidades: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, estando GluR1 y GluR2 implicadas en el desarrollo de la sensibilización comportamental (Carlezon and Nestler 2002; Palmer, Cotton, Henley 2005). De hecho, se ha informado que la morfina y otras drogas de abuso producen regulación al alza tanto de los niveles de proteína como de ARNm de GluR2 (Fitzgerald et al. 1996). Asimismo, se ha demostrado que estas subunidades están distribuidas en áreas cerebrales involucradas en la sensibilización conductual inducida por morfina: estriado, NAc y CPF (Boudreau and Wolf 2005; Palmer, Cotton, Henley 2005). Con la finalidad de evaluar los mecanismos que subyacen a la sensibilización comportamental inducida por morfina, hemos evaluado en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup> los niveles de expresión de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en tres áreas cerebrales implicadas en la sensibilización (NAc, estriado y CPF) tras el tratamiento agudo y repetido con morfina. Nuestros análisis muestran que el tratamiento con morfina produce modificaciones en los niveles de expresión de GluR2 tanto en el NAc como en la CPF y, además en la CPF estos niveles de expresión difieren entre genotipos. Existe un trabajo previo donde detectaron una reducción en los niveles de expresión de GluR2, pero no de GluR3, en la amígdala y el hipocampo de ratas tratadas repetidamente con morfina, no encontrando cambios en el estriado,

CPF e hipotálamo (Sepehrizadeh et al. 2008). Igualmente, nosotros no hemos encontrado modificaciones en la expresión de GluR2 en el estriado pero a diferencia de ellos si las detectamos en la CPF. Estas diferencias podrían ser atribuidas al régimen de administración de morfina, los cuales difieren en gran medida, ya que nosotros hemos utilizado un protocolo de administración crónico de 15 días, con 2 dosis de morfina diarias de 15 mg/kg i.p. y, ellos utilizaron un régimen de administración de morfina de 7 días con una inyección subcutánea al día de 10 mg/kg. Sin embargo, en la literatura existen datos contradictorios al respecto que necesitarían de estudios más exhaustivos acerca de la implicación de la subunidad GluR2 en los mecanismos responsables de la sensibilización. Algunos ejemplos contradictorios: mientras que un estudio sobre la expresión génica en el NAc de GluR2 reveló una supresión en la expresión de GluR2 tras 3 semanas desde el cese de la exposición a morfina y no reveló modificaciones durante el tratamiento con la misma (Spijker et al. 2004), otro postula la implicación de GluR2 en el desarrollo de la sensibilización pero no de su expresión.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) juega un importante papel en los procesos de plasticidad neuronal como el aprendizaje, la memoria y la drogadicción (Aid et al. 2007). De hecho existen numerosos estudios que han propuesto a BDNF como modulador de la plasticidad neuronal y comportamental inducida por la acción de las drogas de abuso en el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (Hyman et al. 1991). En nuestro estudio hemos mostrado que el tratamiento con morfina produce modificaciones en los niveles de expresión de BDNF en el NAc. En particular, el tratamiento agudo y crónico con la droga induce sobreexpresión de este gen en los animales silvestres, siendo esta muy elevada tras el tratamiento crónico (incremento en la expresión= 4). En los animales NK1-/- el tratamiento agudo con morfina no produjo modificaciones en la expresión de BDNF, mientras que el tratamiento crónico con la droga indujo sobreexpresión de BDNF en el NAc, aunque más moderada en comparación con los animales silvestres (incremento en la expresión= 1.5). En concordancia, trabajos previos han demostrado que la administración repetida de morfina incrementa exponencialmente la expresión de BDNF en el hipocampo, estriado dorsal y NAc (Meng et al. 2013), así como la exposición reiterada a heroína produce la

sobreexpresión de los niveles de ARNm en el ATV (Vargas-Perez et al. 2009). Esto mismo ocurre con otras drogas de abuso, existen estudios donde se muestra que la administración crónica en ratas de  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol incrementan la expresión de los niveles de BDNF, tanto del ARNm como de la proteína, en determinadas áreas cerebrales implicadas en la recompensa y la adicción (Butovsky et al. 2005); concretamente, el tratamiento crónico con  $\Delta 9$ -THC produjo una sobreexpresión de BDNF del 10% en el NAc, mientras que el tratamiento agudo con la droga no indujo cambios. Además, en nuestro estudio hemos detectado que los niveles estriatales de BDNF difieren entre genotipos; Morcuende ya informó sobre el incremento de los niveles hipocámpales de BDNF en los animales NK1<sup>-/-</sup> en comparación con los NK1<sup>+/+</sup>, aunque no pudieron correlacionarlo de forma obvia con una mejora en el aprendizaje y la memoria evaluadas en el laberinto de agua de Morris (Morcuende et al. 2003). Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de BDNF inducida por la exposición a morfina desempeña un papel importante en los procesos neuroadaptativos que conllevan a una remodelación a largo plazo tanto funcional como estructural de las conexiones sinápticas.

## **7. Correlación entre la sensibilización locomotora inducida por morfina y los cambios en la expresión génica en el núcleo accumbens, estriado dorsal y corteza prefrontal**

Estudios previos han demostrado que las alteraciones en la plasticidad estructural en diferentes áreas cerebrales inducidas por la autoadministración crónica de morfina difieren entre cepas de ratas identificadas como conductualmente vulnerables o resistentes a la adicción, revelando la importancia de la vulnerabilidad y de las adaptaciones neurofisiológicas producidas por la exposición repetida a opiáceos (Ballesteros-Yanez et al. 2007; Ballesteros-Yanez et al. 2008). En este trabajo hemos correlacionado las diferencias interindividuales en la propensión a la sensibilización locomotora inducida por morfina con las neuroadaptaciones moleculares que subyacen a la exposición repetida a esta droga y que vienen dadas por la alteración en la



expresión de determinados genes implicados en el proceso de adicción y la neuroplasticidad.

Existen estudios que demuestran que la sobreexpresión de  $\Delta$ FosB produce una mayor sensibilidad a la morfina y que esta sobreexpresión es además requerida para que se sensibilice la respuesta a los psicoestimulantes (Nestler 2001a; Nestler 2001b). Sin embargo, los resultados analizados aquí no muestran correlación alguna entre la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora producida por la morfina y la expresión de  $\Delta$ FosB en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. Lo mismo ocurre para los demás genes estudiados excepto para CaMKII, para el que se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la propensión a desarrollar sensibilización locomotora inducida por morfina y la expresión de dicho gen en el NAc; es decir, los animales que han desarrollado una mayor sensibilización presentan una mayor sobreexpresión de este gen en esta área cerebral. Nosotros habíamos hipotetizado sobre que la alteración en la expresión génica de CaMKII podría ser un reflejo de la expresión de la sensibilización locomotora inducida por morfina, y estos datos lo confirman. En concordancia a lo expuesto, Kadivar et al., (Kadivar et al. 2014) demostraron que la sensibilización a morfina producía un incremento significativo en la locomoción y en la expresión de CaMKII en el hipocampo de ratas mientras que la administración aguda no producía dicha sobreexpresión. Además, en este trabajo mostraron que los animales no sensibilizadores a morfina no presentaban cambios significativos en los niveles de expresión de CaMKII mientras que en las ratas sensibilizadas a esta droga se producía un incremento en dichos niveles así como en las actividades  $Ca^{2+}$ /calmodulina-independiente y  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependiente de CaMKII. La implicación de la actividad CaMKII en el desarrollo y expresión de la sensibilización a psicoestimulantes ya había sido descrita previamente; demostrando que la microinyección de inhibidores de la CaMKII en ciertas áreas cerebrales como el NAc y el estriado inhiben las neuroadaptaciones que conllevan a la sensibilización producida por los psicoestimulantes (Kantor, Hewlett, Gnegy 1999; Loweth et al. 2010). Además, observamos una correlación marginal entre la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora y los niveles de expresión de Nurr1 y BDNF en el NAc.

Existe un estudio en el que se recogen los efectos de la morfina sobre la expresión de IEGs en el estriado de ratones pertenecientes a dos cepas congénitas distintas: C57BL/6J y DBA/2J (Ziolkowska et al. 2012) y, cuya respuesta locomotora producida por la droga es marcadamente diferente; la cepa C57BL/6J muestra una notable actividad locomotora tras el tratamiento agudo y crónico con morfina mientras que esta respuesta está ausente en la cepa DBA/2J; el análisis tras el tratamiento crónico con morfina, mediante microarrays, confirma que los patrones de expresión en el estriado de un grupo de 8 genes difiere entre estas dos cepas (fra-2, mcp1, zif268, egr1, egr2, junB, NGFI-B y arc) y además, esta sobreexpresión era mayor al final del tratamiento crónico con la droga en los ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6J mientras que en ese momento esos mismos genes se encontraban subexpresados en la cepa DBA/2J. Este tipo de estudios pone de manifiesto la existencia de diferencias en la vulnerabilidad a drogas entre diferentes cepas de ratón, lo cual correlaciona con diferentes patrones génicos de expresión inducidos por el tratamiento crónico con la droga; nosotros en nuestro estudio hemos querido ir más allá estudiando las diferencias entre individuos dentro de una misma cepa, en nuestro caso MF1, logrando correlacionar el incremento de la actividad locomotora inducido por el tratamiento crónico con morfina con la sobreexpresión de Nurr1 y BDNF en el NAc.

## CONCLUSIONES

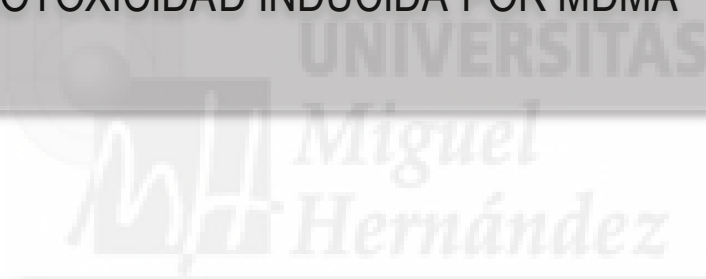




1. La adquisición y expresión de sensibilización locomotora inducida por cocaína está inalterada en los animales NK1<sup>-/-</sup>, mientras que la inducida por morfina está estadísticamente reducida. La clasificación de los animales en sensibilizadores y no sensibilizadores a la droga muestra que el porcentaje de animales de cada subpoblación es similar entre genotipos en el caso de cocaína, mientras que para morfina se observa que los animales mutantes NK1<sup>-/-</sup> sensibilizan en un menor porcentaje.
2. La adquisición y mantenimiento de la autoadministración operante de comida y la motivación por los recompensantes naturales permanecen inalteradas en los animales NK1<sup>-/-</sup>. No se ha encontrado correlación entre la vulnerabilidad a la sensibilización locomotora inducida por morfina y la regulación de la motivación inducida por un refuerzo natural.
3. Los animales NK1<sup>-/-</sup> son capaces de adquirir y mantener un comportamiento de autoadministración operante de morfina. Los animales sensibilizadores a morfina NK1<sup>-/-</sup> presentan una motivación por la droga significativamente menor que los animales sensibilizadores NK1<sup>+/+</sup>. Además, la propensión a la sensibilización motora inducida por morfina no incrementa la persistencia en la búsqueda compulsiva de la droga y por tanto, no representa un factor de vulnerabilidad para el desarrollo de este criterio que caracteriza la conducta adictiva.
4. El tratamiento con morfina induce la sobreexpresión de genes implicados en adicción y plasticidad neuronal en el NAc ( $\Delta$ FosB, BDNF, CaMKII y GluR2), estriado ( $\Delta$ FosB) y CPF (GluR2) y, además los niveles de expresión de algunos de ellos difieren entre genotipos como NAc (CaMKII), estriado (Nurr1 y BDNF) y CPF (GluR2). Por otra parte, existe una correlación significativa y/o marginal entre la propensión a la sensibilización locomotora inducida por morfina y la expresión en los niveles de Nurr1, BDNF y CaMKII en el NAc; por lo que podemos concluir que las modificaciones moleculares, que subyacen al proceso de adicción y a los procesos de plasticidad sináptica, son mayores en los animales sensibilizadores a morfina.



CAPÍTULO II. IMPLICACIÓN DE LA SP EN LA  
NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR MDMA







## LACK OF NEUROPROTECTION AGAINST DOPAMINERGIC NEUROTOXICITY INDUCED BY MDMA IN NK1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE

### Abstract

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), also known as "Ecstasy", is an amphetamine derivative with psychostimulant properties. MDMA is widely used as a recreational drug by young people at clubs and raves. MDMA toxicity appears to be limited to dopamine (DA) producing neurons in mice and causes nerve terminal degeneration in mouse striatum. Neurokinin 1 receptor (NK1) antagonists have been shown to protect methamphetamine neurotoxicity. We investigated the effect of a toxic MDMA schedule (3 x 25mg/Kg, every 2 h) on rectal temperature in NK1 receptor knockout mice (NK1<sup>-/-</sup>). MDMA-treated animals showed hyperthermia compared to saline-treated animals, and the increase in rectal temperature was similar in both genotypes. Long-term effects of MDMA treatment on locomotion, anxiety, and striatal dopaminergic neurotoxicity in NK1<sup>-/-</sup> mice were also evaluated. No locomotor changes were found six days after toxic MDMA treatment, but an anxiogenic effect of the treatment was observed in both genotypes. To establish the degree of dopaminergic toxicity, DA content and its main metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid or DOPAC and homovanillic acid or HVA) in striatum were measured, as well as striatal dopamine transporter sites (DAT). Data showed a marked depletion of DA, DOPAC, and HVA, and a profound decrease in DAT sites in both genotypes. The rewarding properties of MDMA were evaluated in NK1<sup>-/-</sup> animals. Results showed that MDMA displayed a significant conditioned place preference in both wildtypes and knockouts. These results reveal a lack of neuroprotection in NK1<sup>-/-</sup> mice induced by a toxic MDMA regimen, suggesting that NK1 receptor antagonists do not offer a therapeutic advantage against neurotoxicity induced by amphetamine derivatives.

## Conclusions

1. MDMA toxic administration induces an increase in rectal temperature of mutant and wild-type animals, concluding that substance P does not modulate the hyperthermic response.
2. Pretreatment with RP67580, selective antagonist of NK1 receptor, does not block the hyperthermic response induced by MDMA in wild-type animals.
3. The lack of the NK1 receptor does not provide neuroprotection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity.
4. MDMA toxic administration does not induce long-term alterations on locomotor activity in both NK1<sup>-/-</sup> and NK<sup>+/+</sup> animals.
5. MDMA increases anxiety in both NK1<sup>-/-</sup> and NK1<sup>+/+</sup> animals, therefore SP is not able to modulate long-term effects on the levels of anxiety induced by the toxic administration of this drug.
6. MDMA rewarding effects are similar in NK1<sup>-/-</sup> and NK1<sup>+/+</sup> mice, therefore the rewarding properties of this drug does not appear to be mediated by the SP.
7. Probably, NK1 receptor antagonists do not offer a therapeutic advantages over induced amphetamine derivative neurotoxicity.

## INTRODUCCIÓN

“Ecstasy, everything looks wonderful  
when you’re young and on drugs”





## 1. Drogas de síntesis

La denominación “drogas de síntesis” o “drogas de diseño”, éste último término acuñado en los años sesenta por el farmacólogo californiano Gary Henderson, agrupa una serie de sustancias psicoactivas de origen sintético, elaboradas clandestinamente con fines recreativos. Estas sustancias presentan una estructura y propiedades similares a drogas ilegales de amplio consumo ya existentes, pero que al ser nuevos compuestos químicos no están sometidos a restricciones legales.

La amplia variedad de drogas de síntesis se pueden estructurar en varios grupos farmacológicos: feniétilaminas (derivados de las anfetaminas), opiáceos (derivados del fentanilo o de la meperidina), derivados de la metacualona, arilhexilaminas (análogos de la fenciclidina) y, otras drogas de diseño como el gamma-hidroxi-butarato (GHB) o el éxtasis vegetal (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de las “Drogas de diseño”

### FENILETILAMINAS

- Metanfetamina crystal, meth, speed o ice (clorhidrato de metanfetamina)
- TMA-2 (2,4,5-trimetoxi anfetamina)
- DOM (4-metil-2,5 dimetoxi anfetamina) STP
- PMA (parametoxi anfetamina)
- DOB (4-bromo-2,5-dimetoxi anfetamina)
- 2CB-MFT (4-bromo-2,5-dimetoxifenil anfetamina) o “afterturner”
- MDA (3,4-metilenodioxo anfetamina) o “píldora del amor”
- MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina) éxtasis, Adán, “E”, “XTC”, “XX”, MDM, M&M...
- MDEA (3,4-metilenodioxo etilanfetamina), MDE o “Eva”

### OPIACEOS

#### Derivados del Fentanilo:

- AMF (alfametil fentanilo) o “China White”
- 3MF (3 metil fentanilo)
- PFF (parafluoro fentanilo)
- AMAF (alfametilacetil fentanilo)

**Derivados de la Meperidina:**

MPPP (1 metil, 4 fenil, 4 propionoxipiperidina)

MPTP (1 metil, 4 fenil, 1,2,3,6 tetrahidropiridina)

**ARILHEXILAMINAS**

Fenciclidina (PCP) o "polvo de ángel"

PCC (piperidino ciclohexano carbonitrilo)

TCP (tiofeno fenciclidina)

PCE (n-etil fenciclidina)

PHP (fenilciclohexilpirrolidina)

**DERIVADOS DE LA METACUALONA**

Meclocualona

Nitrometacualona

**OTROS**

Gamma-Hidroxi-Butirato (GHB)

Éxtasis vegetal

Entre todas estas sustancias la MDMA es la más conocida debido a su elevado consumo, a sus acciones estimulantes y a que puede producir neurotoxicidad.

## 2. MDMA

### 2.1. Antecedentes históricos

La 3,4,-metilendioximetanfetamina (MDMA), popularmente conocida como "éxtasis", fue sintetizada por vez primera en 1912 en los Laboratorios Merck con la intención de patentarla e introducirla como anorexígeno, aunque nunca llegó a ser comercializada (Shulgin 1986).

En la década de los 70, el psicólogo Leo Zoff comenzó a introducirla con fines terapéuticos con el nombre de Adán, más frecuente en el ámbito de la psicología clínica debido a su capacidad para facilitar las relaciones interpersonales, el acceso al interior de la conciencia del individuo y

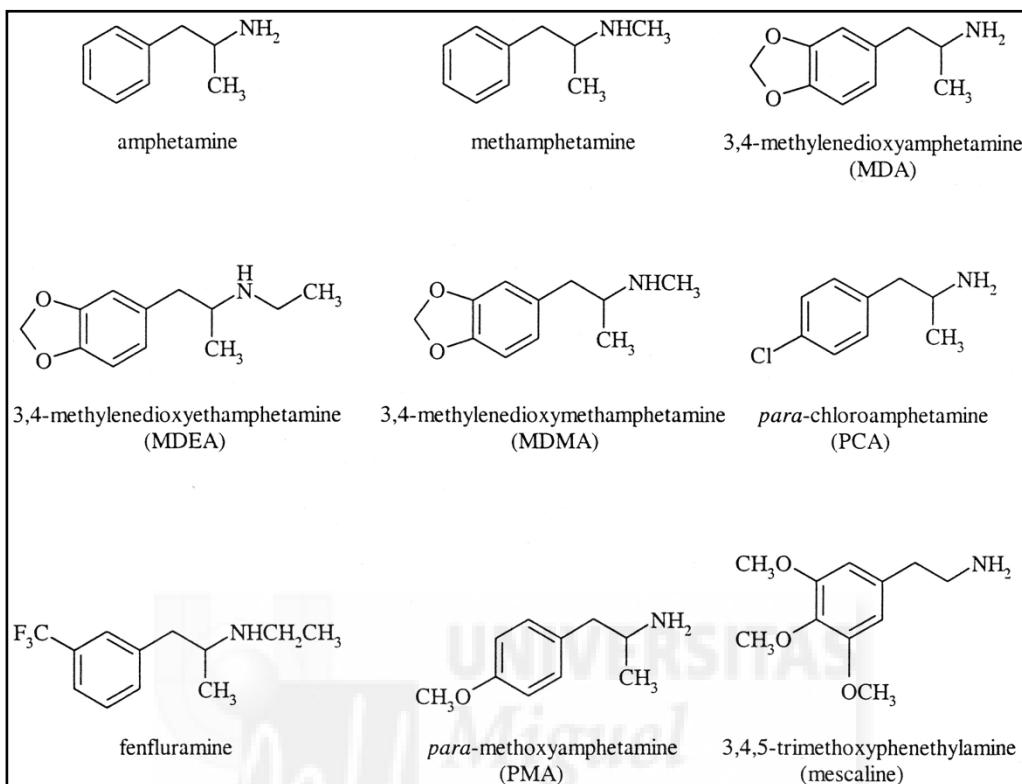
la comunicación entre terapeuta y paciente. Por otro lado, a comienzos de los 80 la MDMA, rebautizada por los vendedores como éxtasis, comenzó a experimentar una creciente popularización entre estudiantes universitarios, yuppies, homosexuales e integrantes del movimiento New Age (movimiento espiritualista para el que la MDMA constituía su droga sacramental) como recurso recreativo, siendo consumida en fiestas para favorecer las relaciones sociales. En los años 80 comienza la exportación de la droga desde América a Europa, primero Ibiza y Valencia, posteriormente, Londres y Manchester. En nuestro país, el consumo de éxtasis sufre una rápida expansión hacia ambientes como las raves (fiestas multitudinarias basadas en la música techno), la ruta del bakalao y los after hours (Bobes García and Sáiz Martínez 2003), alcanzando los máximos niveles de consumo a mediados de los 90 y principios del siglo XXI donde los más jóvenes comienzan a consumir esta sustancia denominada en su jerga como pastillas, pastis o pirulas.

En 1985, la Drug Enforcement Agency (DEA) incluye a la MDMA en la Lista I de la Comprehensive Substances Act, prohibiendo así su consumo terapéutico o recreativo y su tráfico ilegal debido a su alto potencial de abuso, ausencia de aplicación clínica, incumplimiento de la normativa de seguridad exigida por la Food and Drug Administration (FDA) y evidencia de que la 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), compuesto relacionado y principal metabolito del MDMA, inducía degeneración de los terminales nerviosos serotoninérgicos en el cerebro de rata. En el año 1986, la OMS (Organización Mundial de la Salud) incluye a la MDMA en la Lista I de Convenio sobre Psicotrópicos convirtiéndola en una droga ilegal a nivel mundial.

## **2.2. Estructura química**

La 3,4,-metilenodioximetanfetamina es un derivado de la feniletilamina, originado mediante la adición de un grupo metilo al NH<sub>2</sub> de la cadena lateral y de un grupo metilén-dioxi al anillo aromático. El isómero dextro es la forma farmacológicamente más activa. En la Figura 1 se puede observar la estructura química de las principales feniletilaminas.

Figura I. Estructura química de las principales feniletilaminas



(Green et al. 2003)

### 2.3. Farmacocinética

La MDMA se absorbe bien a través del tracto gastrointestinal, alcanzando las concentraciones máximas aproximadamente dos horas después de la administración oral de una dosis única y su semivida de eliminación es de 9 horas (Segura et al. 2001). Atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica debido a su liposolubilidad, de ahí sus efectos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC).

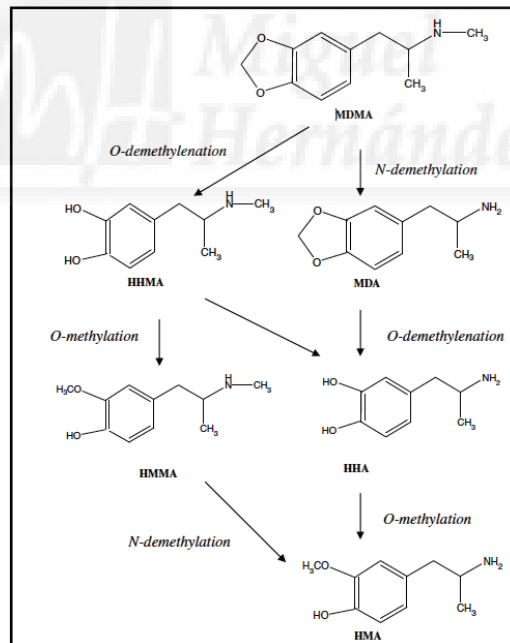
El metabolismo de la MDMA ha sido extensamente estudiado debido a la posible implicación de algunos de sus metabolitos en sus efectos neurotóxicos. La MDMA es metabolizada fundamentalmente en el hígado, obteniéndose numerosos metabolitos distintos que se eliminan principalmente a través de la orina. Sus principales vías metabólicas (Figura 2) son la desmetilación, catalizada fundamentalmente a través de la CYP2D6 dando lugar a la 3,4-



dihidroxiacetanfetamina (HHMA) y después la metilación por la catecolmetiltransferasa (COMT) que producirá 4-hidroxi-3-metoxiacetanfetamina (HMMA). Existe una vía minoritaria de transformación de la MDMA por desmetilación en MDA (3,4-metilenodioxianfetamina), ésta a su vez será desmetilada y metilada para formar 3,4-dihidroxiacetanfetamina (HHA) y 4-hidroxi-3-metoxiacetanfetamina (HMA) respectivamente. La MDA es un metabolito especialmente activo al que se considera parcialmente responsable de la neurotoxicidad de la MDMA; presenta una semivida de eliminación de 24 horas, lo que contribuye a prolongar los efectos de la MDMA.

La MDMA presenta una farmacocinética de saturación, existiendo una tendencia a su acumulación a dosis altas (de la Torre et al. 1999; de la Torre et al. 2000). Esto se debe a la capacidad de la MDMA o de alguno de sus metabolitos para inhibir enzimáticamente al CYP2D6, impidiendo parcialmente la transformación de MDMA a HHMA y HMMA (Farre et al. 2004). Estas características implican un aumento desproporcionado de las concentraciones de MDMA tras dosis altas o repetidas, lo que puede producir incrementos en la toxicidad.

Figura 2. Principales vías metabólicas de la MDMA



(Escobedo et al. 2005)

## **2.4. Efectos agudos del MDMA en ratones**

### **2.4.1. Efectos neuroquímicos**

La administración de MDMA en ratones produce un efecto neuroquímico bifásico en el que distinguimos efectos agudos que son reversibles y efectos a largo plazo, que son persistentes y neurotóxicos.

Existen numerosas evidencias de que la MDMA induce la liberación aguda de dopamina en el cerebro de ratón. Entre estas evidencias encontramos estudios de microdiálisis in vivo en los que la administración de MDMA produce un incremento de la concentración extracelular de dopamina en el estriado (Camarero et al. 2002; Colado et al. 2001), lo que se refleja en una disminución significativa del contenido estriatal de dopamina y sus metabolitos 3 horas después a la administración de la droga (O'Shea et al. 2001).

Los efectos neuroquímicos agudos en ratones contrastan enormemente con los encontrados en ratas en los que la administración de la droga produce, además de efectos neuroquímicos dopaminérgicos similares a los observados en ratones, la liberación aguda de serotonina y una marcada reducción de la concentración de 5-HT en el tejido cerebral pocas horas después su administración (Colado and Green 1994). Sin embargo, en ratones la administración de MDMA solamente induce una leve reducción en la concentración de 5-HT y ácido indolacético (5-HIAA) en corteza, hipocampo y estriado (O'Shea et al. 2001). En humanos, los efectos de MDMA son, al igual que en rata, predominantemente sobre el sistema dopaminérgico y serotoninérgico cerebral (Parrott 2012).

### **2.4.2. Efectos en la temperatura corporal**

De manera similar a lo que encontramos en otras especies, en ratones la respuesta sobre la temperatura corporal inducida por la administración de MDMA generalmente produce hipertermia. La hipertermia consiste en un incremento de la temperatura rectal de los animales, que oscila entre 1,5-2°C y alcanza un pico entre 30-60 min después de la administración de la droga. Aunque esta respuesta es dependiente de la dosis administrada y de la cepa empleada en el estudio. Numerosos grupos han estudiado la respuesta en la temperatura corporal inducida por MDMA observando que produce hipertermia en ratones C57BL/6J (Miller and

O'Callaghan 1994; O'Callaghan and Miller 1994) NIH/Swiss (Colado et al. 2001) y ratones Charles River (Carvalho et al. 2002), pero hipotermia en ratones BALB/c (Johnson et al. 2002).

### **2.4.3. Efectos en la actividad locomotora**

Una de las consecuencias funcionales derivadas de la liberación de dopamina inducida por la administración de MDMA en ratones es el incremento de la actividad locomotora (Itzhak et al. 2003; Miller and O'Callaghan 1994). Además, esta hiperlocomoción parece estar también mediada, al menos en parte, por el transportador de 5-HT (Bengel et al. 1998) y el receptor 5-HT<sub>1B</sub> (Scearce-Levie, Viswanathan, Hen 1999). El trabajo de Scearce-Levie, demostró que los ratones knockout para el receptor 5-HT<sub>1B</sub> solamente mostraban un incremento en la actividad locomotora en respuesta a dosis elevadas de MDMA y que además esta respuesta aparecía con retardo. Estos resultados fueron corroborados mediante la administración en animales silvestres del antagonista del receptor 5-HT<sub>1B/1D</sub>, GR 127935, observando que el incremento de la actividad locomotora inducida por MDMA era bloqueada de manera similar que en los animales knockout.

## **2.5. Efectos a largo plazo del MDMA en ratones**

### **2.5.1. Efectos neuroquímicos**

Los efectos neuroquímicos a largo plazo inducidos por la administración de MDMA son persistentes y neurotóxicos. Estos efectos neurotóxicos son específicos de la especie, ya que existen marcadas diferencias entre el daño neuronal inducido por la MDMA en rata y ratón. En la rata la administración de MDMA produce, a largo plazo, una pérdida de terminales nerviosos serotoninérgicos en la corteza cerebral, estriado e hipocampo (O'Hearn et al. 1988). En contraste con lo que ocurre en la rata, en el ratón la MDMA se comporta como una neurotoxina dopaminérgica selectiva (Logan et al. 1988; O'Callaghan and Miller 1994; Stone, Hanson, Gibb 1987), sin apenas efecto sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA (O'Shea et al. 2001).

La administración repetida de MDMA en ratones produce tanto degeneración de los terminales nerviosos dopaminérgicos en el estriado (Granado et al. 2008a; Logan et al. 1988; O'Callaghan

and Miller 1994) como pérdida de los cuerpos celulares en sustancia negra (Granado et al. 2008b). Esta degeneración terminal dopaminérgica se manifiesta por la reducción significativa de la concentración de DA y sus metabolitos, los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y homovalínico (HVA) en el estriado, la disminución de la actividad de la tiroxina hidroxilasa (TH) en el estriado (Granado et al. 2008a), enzima limitante de la síntesis de DA (O'Callaghan and Miller 1994) y la reducción de la densidad estriatal del transportador de dopamina (DAT) (Reveron, Monks, Duvauchelle 2005). Además, la MDMA causa astrogliosis y activación de la microglia considerados como marcadores de inflamación y neurotoxicidad (Fantegrossi et al. 2008; Miller and O'Callaghan 1995; Thomas et al. 2004).

### **2.5.2. Efectos funcionales**

Los efectos neurotóxicos a largo plazo de la MDMA además de cambios neuroquímicos también producen cambios funcionales. Estudios en humanos proporcionan evidencias claras de los problemas clínicos asociados con el consumo prolongado de éxtasis. En estos estudios se ha observado que los consumidores de MDMA muestran daño cognitivo a largo plazo (Gouzoulis-Mayfrank and Daumann 2009; Verkes et al. 2001), y secuelas psiquiátricas como ansiedad, depresión o aumento de la impulsividad (Morgan et al. 2002; Parrott, Sisk, Turner 2000; Verkes et al. 2001). Sin embargo, en animales de experimentación existen escasas evidencias sobre las alteraciones funcionales a largo plazo inducidas por la administración tóxica de MDMA. Trabajos en ratas reflejan que el tratamiento con MDMA produce a largo plazo deterioro cognitivo (Marston et al. 1999; Morley et al. 2001) y alteraciones en los niveles de ansiedad (Gurtman et al. 2002; Morley et al. 2001; Slikker et al. 1989). Además, otros trabajos en ratas han documentado alteraciones funcionales a largo plazo en la actividad locomotora (Wallace, Gudelsky, Vorhees 2001).

## **2.6. Mecanismos de neurotoxicidad**

Está completamente aceptado que la MDMA es capaz de producir neurotoxicidad. Sin embargo, los mecanismos de acción subyacentes a ella no han sido totalmente identificados hasta el momento aunque existen numerosas evidencias que apuntan hacia diferentes mecanismos que podrían explicar esta neurotoxicidad: hipertermia, formación de un metabolito

neurotóxico de la MDMA y estrés oxidativo entre otros.

### **2.6.1. Hipertermia**

La hipertermia es uno de los efectos agudos adversos más comunes derivado del consumo de MDMA y está directamente relacionado con la mortalidad en los consumidores de éxtasis.

La administración de MDMA en animales de experimentación también induce hipertermia (Green et al. 2003; Johnson, Sharp, Miller 2000; Johnson, O'Callaghan, Miller 2002; Miller and O'Callaghan 1994) y además la severidad de esta respuesta hipertérmica está estrechamente relacionada con un mayor daño neurotóxico a largo plazo inducido por la droga (Malberg and Seiden 1998). Además, la respuesta hipertérmica y por tanto el daño neurotóxico están estrechamente relacionados con la temperatura ambiental, de manera que la administración de MDMA a bajas temperaturas ambientales produce una menor hipertermia y por tanto menor neurotoxicidad (Green et al. 2005; Schmidt et al. 1990), mientras que su administración a altas temperaturas produce una mayor respuesta hipertérmica y en consecuencia la toxicidad se incrementa (Green et al. 2004; Sanchez et al. 2004).

Numerosos estudios sugieren que la hipertermia inducida por la MDMA es debida a la liberación de dopamina producida por la droga. El antagonista del receptor de dopamina D1, DSCH 23390, es capaz de bloquear la hipertermia inducida por la MDMA por lo que la hipertermia debe ser producida por un aumento en la liberación de dopamina, la cual actúa a través de los receptores D1 (Mechan et al. 2002a). Además, en ratas se ha conseguido disociar la respuesta hipertérmica del incremento de 5-HT inducido por la MDMA, indicando que el incremento de la temperatura corporal inducido por MDMA no es consecuencia de la liberación de 5-HT. Esta conclusión es apoyada por diferentes autores que han probado por una parte, la incapacidad de diferentes antagonistas de los receptores de 5-HT para bloquear la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA y por otra, la inhibición del incremento de 5-HT extracelular mediante la administración del inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT, fluoxetina, sin que existan efectos en la respuesta hipertérmica (Berger, Gu, Azmitia 1992; Malberg, Sabol, Seiden 1996; Schmidt and Taylor 1990).

Cabe resaltar la función del hipotálamo como centro regulador de la temperatura corporal, concretamente la región preóptica del hipotálamo se ha propuesto como punto de control de la

hipertermia. Debido al papel del hipotálamo como centro termorregulador se ha hipotetizado acerca de su posible función en la hipertermia y por tanto, en la mortalidad inducida por la MDMA. Se ha demostrado que las neuronas de la región dorsomedial del hipotálamo median la hipertermia inducida por MDMA, ya que la inhibición de las neuronas de esta región atenúa la temperatura corporal y la respuesta locomotora, previniendo la mortalidad inducida por esta droga tanto a temperatura ambiente (Rusynial et al., 2008) como a 32°C (Zaretsky et al. 2014, 2015).

### **2.6.2. Metabolito tóxico de la MDMA**

Se ha hipotetizado acerca de si los efectos agudos y a largo plazo de la MDMA sobre las monoaminas del cerebro de ratón son debidas al compuesto original y/o a un posible metabolito reactivo. Esta hipótesis se confirma cuando se muestra que la administración tóxica en ratones de MDMA intraperitoneal (i.p.) e intraestriatalmente produce diferentes efectos tanto agudos como a largo plazo. Dosis tóxicas de MDMA administradas i.p., pero no intraestriatalmente, producen una reducción del contenido de DA en el estriado una hora después de la última dosis y una reducción de DA siete días después de su administración (Escobedo et al. 2005). El hecho de que los cambios inducidos por la administración i.p. e intraestriatal de la droga sean diferentes indican que la MDMA no es la única responsable de los efectos agudos y a largo plazo, señalando que el compuesto original es metabolizado a otros compuestos responsables de los efectos observados tras la administración periférica.

La identificación de este metabolito o metabolitos neurotóxicos es controvertida a pesar de las numerosas investigaciones existentes (Capela et al. 2007; Green et al. 2003; O'Shea et al. 2002). La MDA es el principal metabolito de la MDMA, más potente como neurotoxina serotoninérgica en ratas (Colado, Williams, Green 1995) e induce hipertermia en ratas y ratones (Colado, Williams, Green 1995; Miller and O'Callaghan 1994). Los mecanismos de toxicidad de ambos compuestos están muy ligados por lo que es razonable suponer que los efectos comportamentales y bioquímicos derivados de la administración de la droga se deben no sólo a la acción de la MDMA si no que la MDA puede ser responsable, bien por sí misma o dando lugar a otro metabolito neurotóxico, de la neurotoxicidad de la MDMA.

Otros compuestos reactivos, como la HHMA, se han estudiado como posibles neurotoxinas o precursores de otros metabolitos neurotóxicos en roedores y humanos (Segura et al. 2001). Sin embargo, la neurotoxicidad específica de los diferentes metabolitos es discutible (Johnson et al. 1992) y necesita ser bien caracterizada.

### **2.6.3. Estrés oxidativo**

La toxicidad de la MDMA parece estar relacionada con el proceso de estrés oxidativo, el cual se sabe que contribuye con el daño neuronal inducido por la droga (Chipana et al. 2008; Jayanthi et al. 1999). Existen numerosas evidencias que sugieren que el incremento en la formación de radicales libres en ratones desempeña un papel crucial en la neurotoxicidad dopaminérgica a largo plazo inducida por la MDMA: la administración de MDMA en ratones produce un incremento de radicales hidroxilo que mediante un proceso de estrés oxidativo aumentan la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN, produciendo su fragmentación en el estriado y sustancia negra (SN) (Camarero et al. 2002; Fornai et al. 2004). Además, diferentes trabajos han mostrado que ratones transgénicos que sobreexpresan el gen humano de la superóxido dismutasa (SOD) son resistentes a la neurotoxicidad inducida por MDMA (Cadet et al. 1995; Cadet, Thiriet, Jayanthi 2001) y la administración de la droga en ratones silvestres produce disminución de la actividad de la SOD y de la glutatión peroxidasa (GPx) y un aumento en la peroxidación lipídica en diferentes áreas del cerebro (Jayanthi et al. 1999).

La MDMA además de incrementar la producción de radicales libres, daña los sistemas antioxidantes del ratón. Se ha probado que la administración de MDMA produce una disminución de las reservas endógenas de vitamina E en el cerebro de ratón, lo cual coincide en el tiempo con la aparición del daño neuronal inducido por la droga y además, los ratones alimentados con una dieta pobre en vitamina E muestran una mayor susceptibilidad a los efectos neurotóxicos producidos por la MDMA (Johnson et al. 2002).

Diversas evidencias explican que la formación de especies reactivas de oxígeno dentro de los terminales dopaminérgicos estriatales es inducida por la MDMA y que tanto la función del DAT como los efectos del MDMA sobre éstos son imprescindibles para comprender la neurotoxicidad inducida por esta droga. Algunos trabajos muestran que cuando la concentración de MDMA es elevada, la droga entra al terminal dopaminérgico por difusión y no

a través de los transportadores de DA (Camarero et al. 2002; Chipana et al. 2008). Además, en el interior del terminal los efectos oxidantes de los radicales libres inactivan al DAT, atrapando a la DA dentro del terminal lo que potencia la formación de especies reactivas de oxígeno y conduce al daño de los terminales nerviosos dopaminérgicos. En resumen, se deduce que la inhibición del DAT producida por la MDMA conduce a una mayor formación de especies reactivas de oxígeno, lo cual potencia la neurotoxicidad inducida por la droga.

## **2.7. Propiedades recompensantes**

Existen numerosas evidencias de las propiedades recompensantes de la MDMA en animales de experimentación. Estas evidencias han sido demostradas comportamentalmente mediante experimentos de autoadministración de MDMA en ratones (Trigo et al. 2006), ratas (Daniela, Gittings, Schenk 2006; Ratzenboeck et al. 2001) y primates no humanos (Fantegrossi et al. 2004; Fantegrossi 2007; Lamb and Griffiths 1987) y mediante el paradigma de preferencia plaza condicionada (Daza-Losada et al. 2007; Robledo et al. 2004). Sin embargo, los efectos recompensantes producidos por la MDMA son menores que los producidos por otras drogas, esto ha sido observado en experimentos de autoadministración en los que un elevado número de animales no alcanzan la adquisición incluso tras largos periodos de entrenamiento (Schenk et al. 2007), programas de condicionamiento operante de baja razón fija no logran mantener la autoadministración de MDMA (Fantegrossi 2007) y que los puntos de corte alcanzados en los programas de condicionamiento de razón progresiva son menores que los alcanzados con cocaína o metanfetamina (Lile, Ross, Nader 2005; Wang and Woolverton 2007).

El incremento de la actividad del circuito mesolímbico dopaminérgico es el sustrato neural común que media las propiedades recompensantes de las drogas de abuso como el alcohol, los psicoestimulantes, la nicotina, los opioides y los cannabinoides (Koob and Le Moal 2001; Pontieri et al. 1996). La MDMA incrementa la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Marona-Lewicka et al. 1996; Robledo et al. 2004; White et al. 1996), lo que parece contribuir, al menos en parte, en las propiedades recompensantes producidas por esta droga.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## Hipótesis de trabajo

La anfetamina y sus derivados son drogas de abuso de amplio uso en la población joven de Europa y Norteamérica. En concreto, la 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) o “éxtasis” es capaz de generar efectos neurotóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas a nivel del sistema nervioso central (SNC) tanto en humanos como en animales (Green et al. 2003).

Trabajos previos (Angulo, Angulo, Yu 2004; Yu, Cadet, Angulo 2002; Yu et al. 2002; Yu et al. 2004) demuestran que la neurotoxicidad inducida por metanfetamina es bloqueada por antagonistas del receptor NK1. Dosis tóxicas de metanfetamina (4 x 10 mg/Kg i.p. a intervalos de 2 h) inducen una reducción del contenido estriatal de DA, DOPAC y HVA así como una disminución de la densidad estriatal del DAT y de la TH. Estos efectos fueron bloqueados casi totalmente por los antagonistas del receptor NK1, L-733,060 y WIN-51,708. La neuroprotección observada utilizando antagonistas selectivos de receptor NK1 debería reproducirse en el animal mutante carente del este receptor (NK1<sup>-/-</sup>) tras la administración de dosis altas y repetidas de derivados anfetamínicos.

Nuestra hipótesis es que los antagonistas NK1 pueden tener efectos neuroprotectores frente a las lesiones dopaminérgicas inducidas por MDMA pudiendo ser útiles en clínica para reducir la neurotoxicidad a largo plazo. Puesto que la afinidad de los antagonistas del receptor NK1 en ratón es baja, los datos ya publicados deben ser corroborados en el ratón mutante carente del gen que codifica para NK1, lo cual es el objeto de este estudio.

De probarse la hipótesis propuesta en este trabajo, la generación de nuevos fármacos que antagonicen las acciones de la SP constituirían una nueva aproximación para el tratamiento de los efectos neurotóxicos del MDMA. Además se puede hipotetizar que el tratamiento con antagonistas de NK1 podría tener efectos protectores frente a otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Huntington.

## Objetivos

El presente estudio pretende examinar la implicación de la SP en los efectos neurotóxicos y recompensantes de la MDMA, utilizando para ello animales knockout para el receptor NK1.

Para el desarrollo de este estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar la implicación de la SP en la modulación de la respuesta hipertérmica inducida por la administración tóxica de MDMA.
2. Evaluar las posibles alteraciones funcionales a largo plazo, sobre la actividad locomotora espontánea y los niveles de ansiedad, debidas a la administración tóxica de MDMA en animales NK1+/+ y NK1-/-:
  - 2.1. Medida de la actividad locomotora espontánea en campo abierto, seis días después del tratamiento tóxico con MDMA.
  - 2.2. Estudio de la expresión de los niveles de ansiedad seis días después de la administración de un régimen tóxico de MDMA, utilizando el ensayo luz-oscuridad.
3. Caracterizar el papel de la SP en la neurotoxicidad estriatal a largo plazo inducida por éxtasis, analizando diversos marcadores de toxicidad terminal dopaminérgica:
  - 3.1. Medida del contenido estriatal de DA, DOPAC y HVA siete días después del tratamiento tóxico con MDMA, mediante HPLC.
  - 3.2. Medida de la densidad estriatal del DAT siete días después del tratamiento tóxico con MDMA, mediante western blot, autorradiografía e inmunohistoquímica.
4. Estudiar las propiedades recompensantes de la MDMA en animales NK1-/-:
  - 4.1. Medida de la actividad locomotora horizontal inducida por la administración aguda de MDMA como biomarcador de sus efectos recompensantes.
  - 4.2. Análisis de las propiedades recompensantes de la MDMA mediante el ensayo de preferencia de plaza condicionada (CPP).

## MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. Animales de experimentación

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos adultos NK1<sup>-/-</sup> y silvestres (NK1<sup>+/+</sup>). Los ratones originales fueron obtenidos por recombinación homóloga de blastocistos C57BL/6J inyectados con células madre 129/sv que presentaban una disrupción dirigida del gen que codifica el receptor NK1 (De Felipe et al. 1998). Los ratones utilizados en este trabajo fueron obtenidos mediante 10 generaciones de cruces sucesivos de la línea original C57BL/6J x 129/sv con ratones C57BL/6J. Estos animales fueron denominados NK1<sup>-/-</sup> backcross y NK1<sup>+/+</sup> backcross.

Los procedimientos experimentales fueron realizados siempre por la mañana. Los animales fueron estabulados en grupos de 4-5 en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 1$  °C), humedad (55%), iluminación (ciclo luz-oscuridad de 12 h) y agua y comida *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Miguel Hernández de Elche y fueron realizados de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC).

## 2. Medida de la temperatura corporal

La droga utilizada fue (+)MDMA HCl (Sigma-Aldrich) disuelta en NaCl al 0.9% (salino) e inyectada en un volumen de 10 ml/kg. Los animales recibieron un régimen neurotóxico de 3 inyecciones de MDMA (25 mg/kg i.p.) separadas a intervalos de 3 horas. Las dosis fueron calculadas en términos de droga base. Los animales del grupo control siguieron el mismo protocolo experimental excepto que fueron inyectados con salino. Los efectos se evaluaron 7 días después del tratamiento (efecto a largo plazo). La dosis, el protocolo de administración y el momento de evaluación de los efectos son similares a los utilizados en estudios previos donde se muestra que la MDMA induce en ratones una reducción del contenido estriatal de dopamina (O'Shea et al. 2001).

Las temperaturas rectales se midieron usando un termómetro digital (BAT-12 thermometer, PHysitemp Instruments, Clifton, NJ, USA), con una resolución de 0,1 °C y precisión de  $\pm 0,1$

°C, acoplado a una sonda rectal para ratón (RET-3, World Precision Instruments). La sonda se introdujo 2 cm en el recto del animal, obteniéndose una lectura estable tras 10 segundos. Las medidas de temperatura fueron tomadas 1 h antes de la primera inyección de MDMA, inmediatamente antes y 30 min después de las inyecciones de MDMA, y cada hora después hasta un total de 12 medidas.

La segunda parte del experimento consistió en mostrar los efectos del antagonista selectivo del receptor NK1, RP67508 (1635 TOCRIS Bioscience), en la hipertermia inducida por un régimen neurotóxico de MDMA (3 x 25 mg/kg, i.p. separadas por intervalos de 3 h). Animales silvestres recibieron dos inyecciones, de vehículo o RP67508, 30 minutos antes de la primera y la tercera inyección de MDMA (7,5 mg/kg, i.p.). Las dosis y el protocolo de administración son similares a los utilizados en estudios previos donde se muestra que el antagonista RP67508 previene los efectos neurotóxicos inducidos por la administración tóxica de METH (Yu et al., 2002). RP67508 se disolvió en DMSO al 5% (Sigma-Aldrich) en salino. Las medidas de las temperaturas fueron tomadas según hemos descrito previamente.

### **3. Actividad locomotora**

La actividad locomotora se midió en un campo abierto de color negro (50 cm x 50 cm x 30 cm de alto) y bajo condiciones de baja iluminación (40 lux). Los ratones fueron colocados individualmente en el centro del campo y la actividad locomotora fue registrada automáticamente mediante un sistema de videotracking (SMART; Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking. Panlab).

La actividad locomotora espontánea se midió 6 días después del tratamiento tóxico con MDMA. La duración de la sesión fue de 10 minutos y la actividad locomotora fue expresada como distancia recorrida (cm) durante la sesión completa.

Sin embargo, la actividad locomotora inducida por MDMA se midió 5 minutos después de la inyección con MDMA (10 mg/kg i.p.) o salino. La duración de la sesión fue de 1 hora y la actividad locomotora fue expresada como distancia recorrida (cm) durante los últimos 5 minutos.



#### **4. Ensayo luz-oscuridad**

Este ensayo está basado en la aversión innata de los roedores por áreas intensamente iluminadas y en la conducta exploratoria espontánea de los roedores en respuesta a estresores medios: un ambiente nuevo y un área intensamente iluminada. De este modo los animales están enfrentados al conflicto entre el deseo de explorar una nueva área y la aversión hacia la elevada iluminación. El ensayo de luz-oscuridad ha sido ampliamente utilizado para predecir comportamientos ansiolíticos en ratones, lo cual se refleja en un aumento del tiempo de permanencia o número de entradas en el compartimento iluminado (Hascoet, Bourin, Nic Dhonnchadha 2001).

El ensayo de luz-oscuridad se realizó 6 días después del tratamiento tóxico con MDMA. El aparato consiste en un compartimento pequeño de color oscuro (27 x 18 x 27 cm alto) conectado por una abertura de 7 x 7 cm con un compartimento grande de color claro (27 x 27 x 27 cm). El compartimento claro está intensamente iluminado (500 lux) comparado con el compartimento oscuro (10 lux). Cada sesión tuvo una duración de 10 minutos, comenzando con la colocación del animal en el compartimento oscuro mirando hacia el compartimento claro. Se cuantificaron tanto el número de entradas como el tiempo de permanencia en el compartimento claro, considerando como entrada cuando el animal posiciona sus cuatro patas en dicho compartimento. Además, se registraron las tentativas de entrada al compartimento claro como posible índice de ansiedad, donde se incluyen las posturas de “stretch-attend” y “flat-back” (Blanchard et al. 1990).

#### **5. Análisis de la concentración de DA y sus metabolitos en estriado mediante HPLC**

Siete días después del tratamiento tóxico con MDMA los animales fueron decapitados, los cerebros fueron extraídos y los cuerpos estriados de ambos hemisferios de cada animal disecados, pesados y congelados independientemente a -80°C para su posterior procesamiento.

Los estriados de uno de los hemisferios de cada animal fueron homogeneizados, mediante sonicación, en 500  $\mu$ l de solución de homogeneización (ácido perclórico 20mM, metasulfito sódico 0,01%, cisteína 0,01%, EDTA 0,01%). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue congelado a -80°C para su posterior análisis.

El análisis de la concentración de DA y sus metabolitos se realizó utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección electroquímica en el laboratorio de la Dra. Isabel Colado. Brevemente, la fase móvil consistió en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M), ácido octanesulfónico (0,16 mM), EDTA (0,1 mM) y metanol (16%), y el pH fue ajustado a 3 con ácido fosfórico, filtrado y desgasado. El caudal fue 1 ml/min y el potencial de trabajo del electrodo fue ajustado a + 0,4 V. El sistema de HPLC consiste en una bomba (Waters, 510), unida a un inyector automático de muestra (Loop 200  $\mu$ l, Waters 717 plus Autosampler), una columna de fase inversa de acero inoxidable (Spherisorb ODS2, 5  $\mu$ m, 150 X 4,6 mm<sup>2</sup>) equipada con una precolumna, y un detector colorimétrico (Coulchem II, Esa, USA). La corriente producida fue monitorizada usando un programa de integración (Unipoint, Gilson).

## **6. Western Blot del Transportador de Dopamina**

El otro cuerpo estriado de cada animal fue homogeneizado mediante sonicación en tampón de lisis (320 mM sacarosa, 5 mM HEPES, 5 mM EDTA, y 40  $\mu$ l/ml de un cóctel de inhibidores de proteasas (P8340 Sigma- Aldrich)).

El homogeneizado se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a 4°C, y seguidamente la fracción del sobrenadante se centrifugó a 28000 g durante 30 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en el tampón de lisis y la concentración de proteína se determinó mediante el método Bradford, usando como estándar albúmina de suero bovino. Las muestras se desnaturalizaron en tampón de muestra Laemmli durante 5 min a 100 °C. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína de cada muestra homogeneizada por pocillo en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por transferencia húmeda a intensidad constante (200 mA, 2 h a 4°C). Las membranas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con leche en polvo al 7,5% en TTBS (1 M Tris, 0,9% NaCl y 0,1%

Tween-20) para bloquear los lugares de unión inespecíficos. Posteriormente, estas membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios, rat  $\alpha$ -DAT (1:5000, Chemicon) para la detección de DAT y, mouse  $\alpha$ - $\beta$ -actina (1:10000) para la detección de actina como control de carga. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con HRP (Horseradish peroxidase protein),  $\alpha$ -rat-HRP (1:5000) y  $\alpha$ -mouse-HRP (1:4000) respectivamente y se revelaron mediante quimioluminiscencia con ECL (Enhanced chemiluminescence; Amersham Biosciences). Para el análisis densitométrico se usó el programa ImageJ, el cual permite cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas por western blot utilizando para ello imágenes digitalizadas. La densidad óptica para DAT de cada una de las muestras fue normalizada dividiendo por su control de carga dado por la  $\beta$ -actina.

## 7. Inmunohistoquímica del Transportador de Dopamina

Siete días tras el tratamiento tóxico con MDMA, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (0,1 ml/40 g i.p.) (Dolethal, Vétoquinol) y perfundidos intracardiamente con una solución de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB), para limpiar el tejido, seguido de paraformaldehído al 4% frío en PB, para fijar los tejidos. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se introdujeron en la misma solución fijadora durante 4 horas, seguido de una solución de sacarosa al 30% (en PB 0,1 M, pH 7,4 y 0,02% azida sódica) hasta conseguir una adecuada crioprotección.

Los cerebros se seccionaron en cortes de 40  $\mu$ m de grosor mediante un micrótopo de congelación, siendo recogidos en sacarosa al 5% (en PB 0,1 M, pH 7,4). Tras un breve lavado en PB 0,1 M, las secciones fueron incubadas con una solución de bloqueo (suero de cabra al 3% en PB 0,1 M) a temperatura ambiente, en agitación suave y continua, durante 1 hora, para bloquear todos los puntos inespecíficos de unión del anticuerpo secundario en el tejido y reducir así el fondo de la preparación. A continuación las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (1:5000 rat  $\alpha$ -DAT, Chemicon) en TTBS (0,05 M Tris salino pH 7,4, tritón X-100 al 0,3 %) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua y suave. Tras esta incubación se realizaron tres lavados consecutivos con PB 0,1 M de 10 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario (1:1000 goat  $\alpha$ -rat, Alexa 555) en

TTBS, 2 h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PB 0,1M de 10 min. Los cortes se montaron sobre portaobjetos BDH Superfrost/Plus con Vectashield (Vector) y fueron conservados a 4°C para su posterior análisis en microscopio confocal.

## **8. Autorradiografía del Transportador de Dopamina**

Los experimentos de autorradiografía de DAT fueron llevados a cabo de acuerdo a lo publicado por Yu et al., (Yu, Cadet, Angulo 2002). Brevemente, siete días después del tratamiento tóxico con MDMA los animales fueron decapitados y los cerebros extraídos y congelados a -80°C para su posterior procesamiento.

De cada cerebro se obtuvieron, mediante criostato, 9 secciones estriales de 20  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron montadas sobre portaobjetos BDH Superfrost/Plus, y almacenadas a -80°C. Las secciones se secaron a temperatura ambiente durante 3 horas y se incubaron con 0,039 nM [ $^{125}\text{I}$ ]RTI-121 (2200 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) en tampón (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10,14 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1,76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaI) durante 60 min a temperatura ambiente. La unión no específica del ligando fue determinada utilizando 10  $\mu\text{M}$  GBR-12909 (Sigma-Aldrich). Tras la incubación se realizaron dos lavados de 20 minutos con tampón frío, y con agitación suave y ocasional. A continuación las secciones fueron sumergidas 3 veces en agua destilada fría durante 5 minutos cada vez. Inmediatamente después, para evitar la disociación del ligando, las secciones fueron secadas rápidamente utilizando un secador y durante las siguientes 8-10 horas fueron mantenidas a temperatura ambiente. Los portaobjetos conteniendo las secciones fueron colocados en casetes herméticos protegidos de la luz y expuestos a películas autorradiográficas Hyperfilm MP (Amersham PHarmacia, Piscataway, NJ, USA) durante 22 horas a -20°C. Las películas fueron reveladas en un procesador automático (CP 1000, AGFA) y, la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]RTI-121 a las secciones de tejido estriatal se cuantificó por densitometría usando el programa de análisis de imagen, ImageJ. La cuantificación densitométrica se realizó sobre el estriado completo de ambos hemisferios, de los cuales se realizó una media, de 6 secciones estriales de cada cerebro. La densidad óptica (DO) del DAT para cada animal fue obtenida realizando la media de las densidades ópticas estriales de las 6 secciones cuantificadas.

## 9. Ensayo de preferencia de plaza condicionada

Las propiedades recompensantes de la MDMA se midieron utilizando el ensayo de preferencia de plaza condicionada. El aparato utilizado es el descrito por Matthes et al. (Matthes et al. 1996), el cual consta de dos compartimentos cuadrados (15 x 15 x 15 cm), con distintos estímulos visuales y táctiles que pueden ser identificados por el animal, unidos por un área central triangular neutra. El animal aprende a relacionar uno de los compartimentos con los efectos recompensantes que le produce la droga inyectada y en él pasará más tiempo el día del test.

El ensayo de CPP se realizó de acuerdo con la descripción previa de Robledo et al. (Robledo et al. 2004). Uno de los compartimentos del aparato es elegido al azar para la asociación de la droga y el otro para el salino. Ningún grupo experimental reveló preferencia inicial por ninguno de los compartimentos. Se puso especial atención en contrabalancear, lo más exactamente posible, los tratamientos entre los compartimentos. La intensidad de la luz en los compartimentos de condicionamiento fue de 30 lux. El protocolo del CPP consiste en tres fases: (1) Fase de preconditionamiento, durante la cual el animal tiene libre acceso a los dos compartimentos, registrándose su permanencia en cada uno durante 20 minutos. El tiempo empleado en cada compartimento se registró automáticamente mediante un sistema de videotracking (SMART; Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking. Panlab). (2) Fase de condicionamiento, durante la cual los animales son inyectados con la droga (MDMA, 10 mg/kg, i.p.) y confinados durante 30 minutos en uno de los compartimentos los días 1, 3, 5, 7 y 9; y durante los días 2, 4, 6, 8 y 10 los animales son tratados con vehículo y confinados en el compartimento contrario. Los animales son colocados en el compartimento correspondiente 30 minutos después de recibir la inyección. (3) Fase de test, realizada 24 h después de la última sesión de condicionamiento y es idéntica a la fase de preconditionamiento, es decir, libre acceso del animal a ambos compartimentos durante 20 minutos. Los resultados se expresaron como puntuación de preferencia de plaza condicionada o "score", calculada como la diferencia entre el tiempo empleado en la fase de test y en la fase de preconditionamiento en el compartimento asociado con la droga.

## 10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Program for Social Science) en su versión 16 para Mac.

En el caso de analizar una única variable dependiente, se utilizó el modelo lineal generalizado (GzLM) sin medidas repetidas. Este método estadístico se caracteriza por ser una herramienta más flexible que los GLM debido a que se pueden elegir distintos tipos de distribución y diferentes estructuras de la covariancia de los datos de las medidas repetidas. Además, no se elimina un sujeto con valores perdidos y no requiere las condiciones de aplicación de normalidad y homogeneidad de variancias.

En el caso del análisis mediante medidas repetidas y debido a que en algunos casos no se cumplieron los criterios esenciales para realizar el estudio mediante GLM, se utilizó en todos los experimentos un análisis GzLM con medidas repetidas (ecuaciones estructurales generalizadas; GEE; (Hardin JM 2003), bajo una distribución normal. La significación de los efectos estadísticos encontrados mediante este procedimiento se determinó mediante la prueba de chi-cuadrado de Wald usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida.

Los factores inter e intra-sujetos serán comentados en los resultados de cada experimento para una mejor comprensión. En el caso de encontrar interacciones estadísticamente significativas, se realizaron las descomposiciones sucesivas apropiadas.

El criterio de significación en todos los casos se estableció en  $p < 0,05$ , y la significación marginal ( $0,1 > p > 0,05$ ) se muestra sólo como información adicional.



**RESULTADOS**

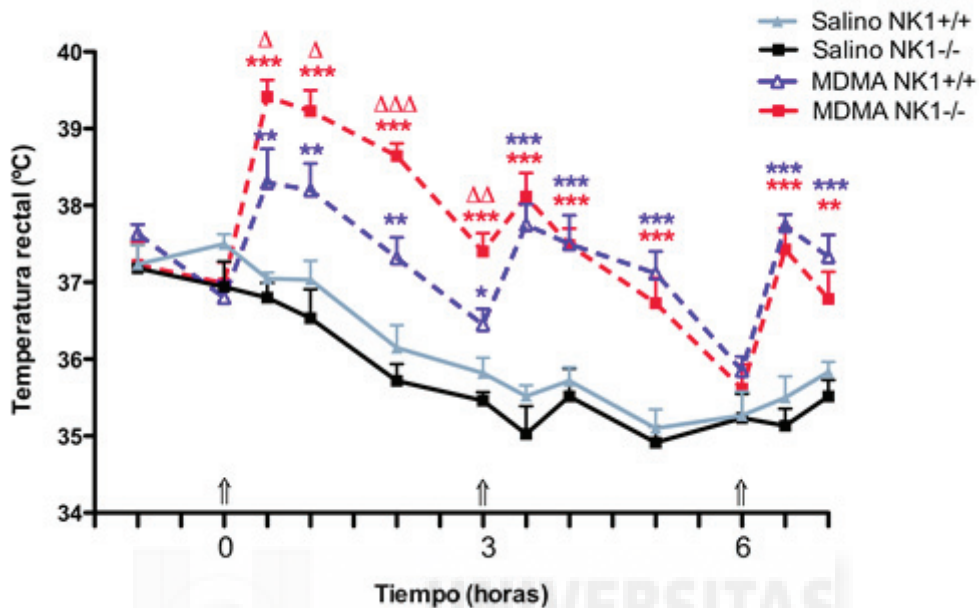




## 1. Efecto de la administración tóxica de MDMA sobre la temperatura corporal en animales NK1+/+ y NK1-/-

En este experimento analizamos el efecto del tratamiento tóxico con MDMA sobre la temperatura rectal de animales NK1+/+ y NK1-/- (Fig. 1). Para ello se utilizó el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos y la dinámica temporal como factor intrasujetos (con 12 niveles).

El GEE reveló un efecto de tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 204,078$   $p<0,001$ ) y de tiempo (Wald  $\chi^2(11)= 809,518$ ,  $p<0,001$ ), así como una interacción tratamiento x tiempo (Wald  $\chi^2(11)= 347,032$ ,  $p<0,001$ ), genotipo x tiempo (Wald  $\chi^2(11)= 42,510$ ,  $p<0,001$ ), genotipo x tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 7,608$ ,  $p<0,01$ ) y genotipo x tratamiento x tiempo (Wald  $\chi^2(11)= 54,857$ ,  $p<0,001$ ). La descomposición de la interacción mostró que el tratamiento con MDMA (3 x 25 mg/Kg i.p., a intervalos de 3 h) incrementó la temperatura rectal después de cada inyección, comparado con los animales tratados con salino, en ambos genotipos, alcanzando el máximo incremento de temperatura 30 minutos después de cada inyección. La hipertermia se mantuvo, en ambos genotipos, hasta 2 h después de la primera y la segunda inyección de MDMA y hasta 1 hora después de la tercera inyección de MDMA. Además, la respuesta hipertérmica producida por la primera inyección de droga fue significativamente mayor en los animales NK1-/- que en los animales silvestres y, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún otro punto de la curva de temperatura rectal. De este experimento podemos concluir que la hipertermia inducida por la administración tóxica de MDMA no está mediada por SP, ya que es similar en ambos genotipos.

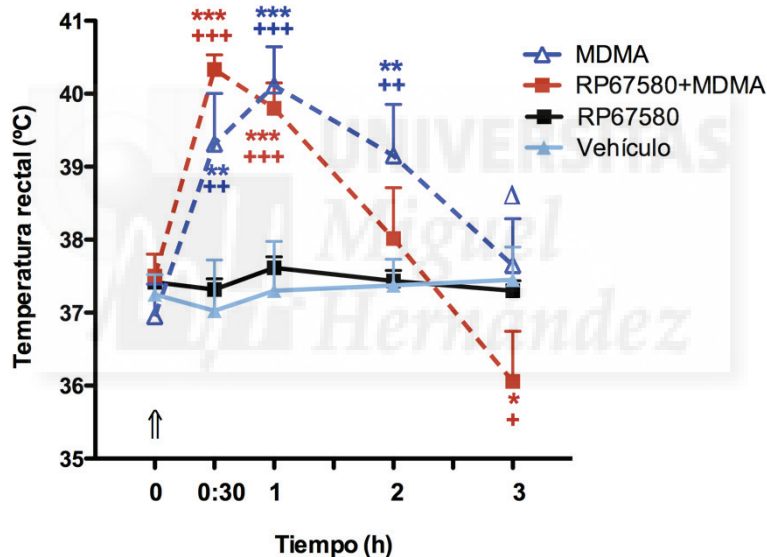


**Figura 1. Temperatura rectal durante la administración tóxica de MDMA (3 x 25 mg/kg, i.p. a intervalos de 3 h) en animales NK1+/+ y NK1-/-. Cada punto representa la media  $\pm$  S.E.M (n=6-7/grupo) de la temperatura rectal. Las flechas indican las inyecciones de droga. El análisis GEE mostró que la MDMA (3 x 25 mg/Kg i.p., a intervalos de 3 h) incrementó la temperatura rectal en ambos genotipos, alcanzando el pico máximo 30 min. después de cada inyección (\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. su respectivo grupo salino). La descomposición de la interacción apropiada mostró un incremento mayor en la temperatura rectal de los animales NK1-/– comparado con los NK1+/+ ( $^{\wedge}$   $p < 0,05$ ;  $^{\Delta\Delta}$   $p < 0,01$ ;  $^{\Delta\Delta\Delta}$   $p < 0,001$  vs. NK1+/+) después de la primera inyección de MDMA.**

En el siguiente experimento analizamos el efecto de la administración del antagonista del receptor NK1, RP67580, antes de la administración con MDMA sobre la temperatura rectal de animales silvestres (Fig. 2). Para ello se utilizó el modelo GEE con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos y la dinámica temporal como factor intrasujetos (con 5 niveles).

El análisis estadístico mostró efectos significativos de tratamiento (Wald  $\chi^2(3) = 18,256$

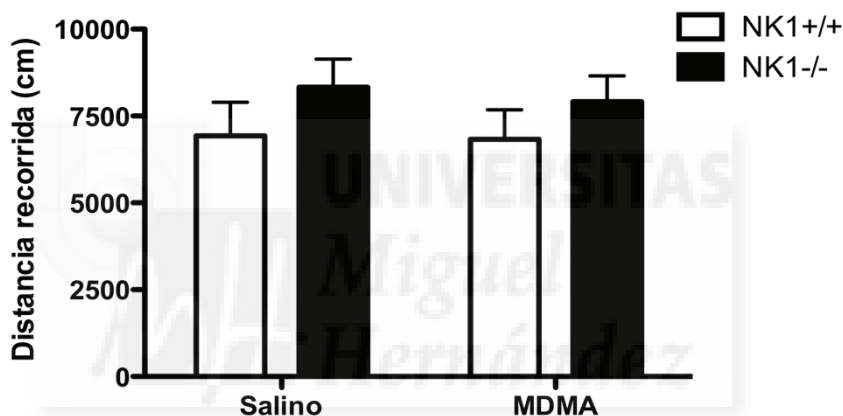
$p < 0,001$ ) y tiempo (Wald  $\chi^2(4) = 73,771$ ,  $p < 0,001$ ), e interacción tratamiento x tiempo (Wald  $\chi^2(12) = 171,362$ ,  $p < 0,001$ ). Las comparaciones por pares apropiadas revelaron que tanto los animales tratados con MDMA como con RP67580+MDMA mostraron incrementos de las temperaturas rectales similares comparado con los animales tratados con RP67580 y con vehículo. Además, la descomposición de la interacción mostró diferencias en las temperaturas rectales, entre lo grupos tratados con MDMA y con RP67580+MDMA, 3 h después de la inyección de MDMA donde la temperatura rectal de los animales tratados con RP67580+MDMA alcanza niveles de hipotermia, mientras que los animales tratados con MDMA vuelven a los niveles basales. Por tanto, el pretratamiento con el antagonista selectivo del receptor NK1, RP67580, no frena la hipertermia inducida por el MDMA.



**Figura 2.** Efecto del antagonista del receptor NK1, RP67580, (7,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes de la administración de MDMA (25 mg/kg i.p.) en la temperatura rectal de animales silvestres. Cada punto representa  $\pm$  S.E.M (n=4-9/grupo) de la temperatura rectal. Las flechas indican las inyecciones de droga. El análisis GEE mostró un incremento similar en la temperatura rectal en los animales tratados con MDMA y con RP67580+MDMA (\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo RP67580 y +  $p < 0,01$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  vs. grupo vehículo). La descomposición de la interacción mostró diferencias en la temperatura rectal, entre los grupos tratados con MDMA y RP67580+MDMA, 3 h después de la inyección con MDMA (^  $p < 0,05$  vs. RP67580+MDMA).

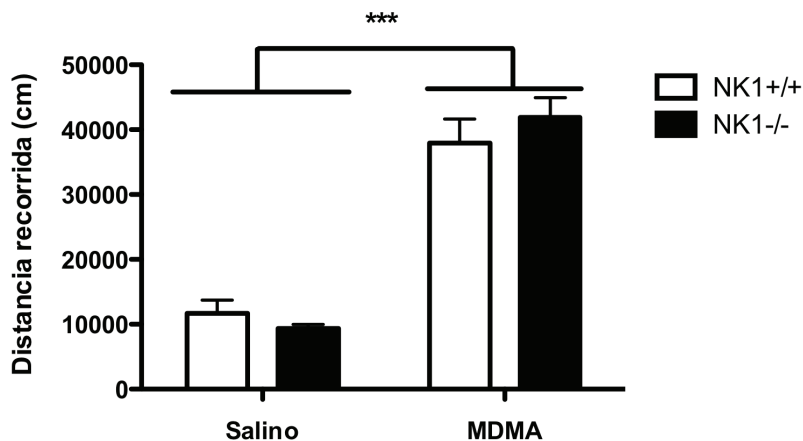
## 2. Efecto del MDMA sobre la actividad locomotora en animales NK1+/+ y NK1-/-

Por un lado quisimos estudiar el efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la actividad locomotora espontánea en animales NK1+/+ y NK1-/-. Este análisis de la actividad locomotora espontánea en el campo abierto seis días después del tratamiento tóxico con MDMA (Fig. 3) se realizó mediante el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. Los resultados del GzLM no revelaron diferencias estadísticamente significativas en la distancia recorrida en ninguno de los dos genotipos, concluyendo que la administración tóxica de MDMA no produce alteraciones funcionales a largo plazo sobre la actividad locomotora.



**Figura 3.** Actividad locomotora espontánea seis días después del tratamiento tóxico con MDMA (3 x 25 mg/Kg i.p., a intervalos de 3 h) en animales NK1+/+ y NK1-/-. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. (n=5-6/grupo) de la distancia recorrida.

Por otro lado quisimos evaluar la actividad locomotora horizontal en el campo abierto inducida tras la administración aguda de MDMA (10 mg/Kg i.p.) en animales NK1+/+ y NK1-/-. Este análisis se hizo utilizando el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. El análisis GzLM de la distancia recorrida (Fig. 4) reveló únicamente un efecto significativo del tratamiento con MDMA (Wald  $\chi^2(1) = 89,399$ ;  $p < 0,001$ ). Estos resultados muestran que la administración aguda de MDMA produce un incremento en la actividad locomotora de los animales de ambos genotipos.

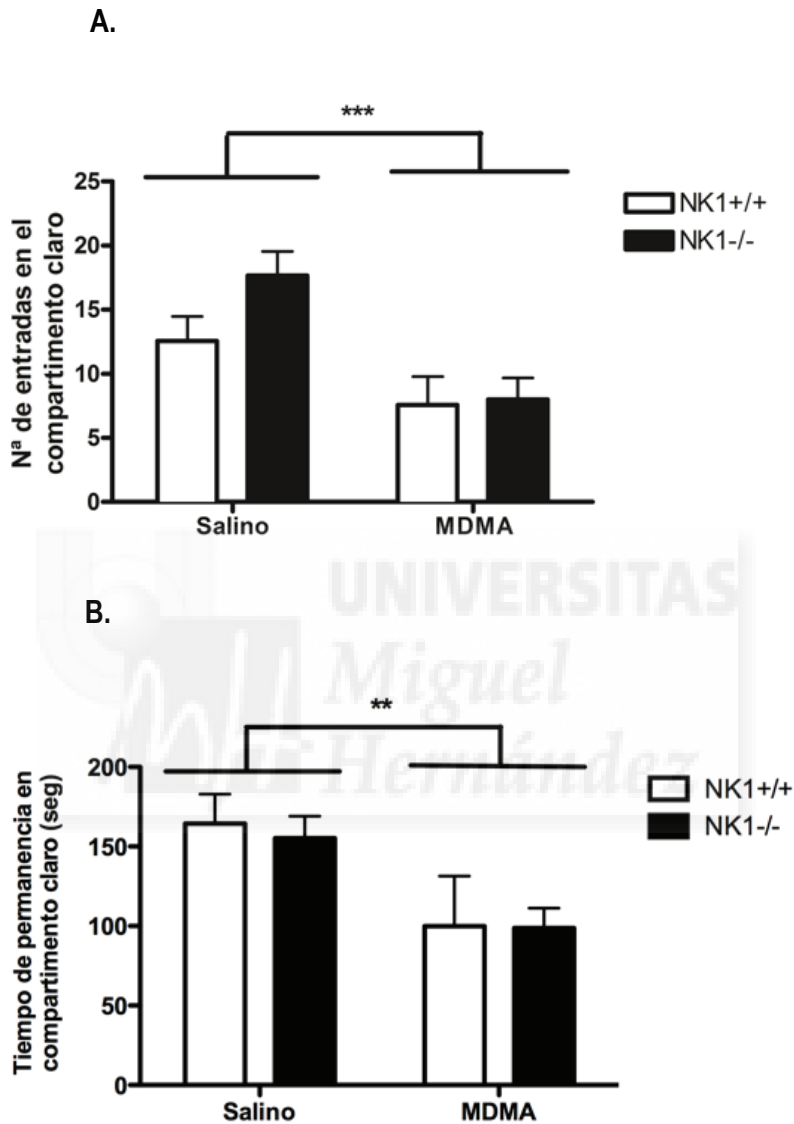


**Figura 4. Actividad locomotora inducida por MDMA (10 mg/kg i.p.) en animales NK1+/+ and NK1-/-.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. (n=6-12/grupo) de la distancia recorrida. El análisis GzLM no reveló efecto de genotipo ni interacción tratamiento x genotipo, pero se encontró un efecto significativo de tratamiento (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. grupo salino) en la distancia recorrida.

### 3. Efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la ansiedad medida en el ensayo luz-oscuridad en animales NK1+/+ y NK1-/-

Los resultados del ensayo luz-oscuridad se analizaron utilizando el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. El análisis estadístico del número de entradas en el compartimento claro (Fig. 5A) reveló un efecto significativo del tratamiento con MDMA (Wald  $\chi^2(1) = 14,737$ ;  $p < 0,001$ ) pero no efecto de genotipo o interacción tratamiento x genotipo. Los animales tratados con MDMA, independientemente del genotipo, mostraron un menor número de entradas en el compartimento claro. Igualmente, el análisis GzLM del tiempo empleado en el compartimento claro (Fig. 5B) reveló únicamente un efecto estadísticamente significativo de tratamiento (Wald  $\chi^2(1) = 7,817$ ;  $p < 0,01$ ). Este análisis mostró que los animales, de ambos genotipos, tratados con MDMA emplearon menos tiempo en el compartimento claro que los animales tratados con salino. Además, se midió tanto la actividad espontánea como el comportamiento de "stretch-attend" en el compartimento claro, no encontrándose diferencias entre grupos; respecto a la postura de "stretch-attend" no fueron cuantificadas debido a su escasez. Por tanto, podemos concluir que el régimen tóxico con

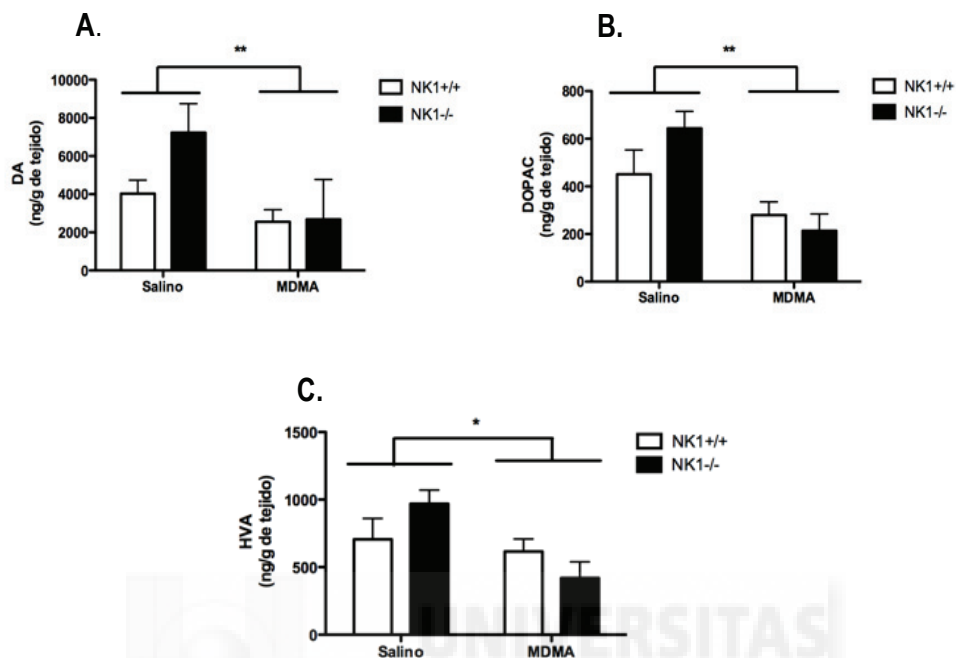
MDMA induce un aumento de la ansiedad, persistente hasta 6 días después del tratamiento, en animales de ambos genotipos.



**Figura 5. Ensayo luz-oscuridad seis días después del tratamiento tóxico con MDMA (3 x 25 mg/Kg i.p., a intervalos de 3 h) en animales NK1+/+ y NK1-/-. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. (n=4-7/grupo) del número de entradas (5A) y del tiempo empleado (5B) en el compartimento claro. El análisis GzLM no reveló efecto de genotipo ni interacción tratamiento x genotipo, pero se encontró un efecto significativo de tratamiento (5A. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo salino; 5B. \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo salino) en las dos medidas registradas.**

#### 4. Efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la concentración estriatal de DA y sus metabolitos en animales NK1+/+ y NK1-/-

El análisis de la concentración de DA y sus metabolitos mediante HPLC siete días después del tratamiento tóxico con MDMA (Fig. 6) se realizó mediante el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. El análisis del contenido estriatal de dopamina (Fig. 6A) mostró un efecto significativo de tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 6,695$ ;  $p=0,01$ ) pero no efecto de genotipo ni interacción tratamiento x genotipo. Igualmente, el análisis GzLM de la concentración de DOPAC (Fig. 6B) y HVA (Fig. 6C) reveló únicamente un efecto estadísticamente significativo de tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 8,880$ ;  $p<0,01$ ; Wald  $\chi^2(1)= 4,558$ ;  $p<0,05$ ). La reducción del contenido estriatal de dopamina comparado con el grupo salino del mismo genotipo fue del 36,5 % en NK1+/+ y del 62,9 % en NK1-/. Para el contenido estriatal de DOPAC, el tratamiento con MDMA indujo una reducción del 38,05 % en NK1+/+ y del 66,85 % en NK1-/. Finalmente, para el contenido estriatal de HVA observamos una reducción del 12,08 % en NK1+/+ y del 56,69 % en NK1-/. Por tanto, la ausencia del receptor NK1 no proporciona neuroprotección frente a la depleción del contenido estriatal de DA, DOPAC y HVA inducida por la administración de un régimen tóxico de MDMA.



**Figura 6. Concentración estriatal de DA, DOPAC y HVA siete días después del tratamiento tóxico con MDMA (3 x 25 mg/kg, i.p. a intervalos de 3 h) en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>.** Cada barra representa la media  $\pm$  SEM (n=5-6/grupo) de la concentración de los metabolitos. El análisis GzLM no reveló efecto de genotipo ni interacción tratamiento por genotipo, pero mostró un efecto estadísticamente significativo de tratamiento en la concentración de DA (\*\* p=0,01 vs. grupo salino), DOPAC (\*\* p<0,01) y HVA (\* p<0,05).



## 5. Efecto a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la densidad estriatal del DAT en animales NK1+/+ y NK1-/- analizado mediante western blot

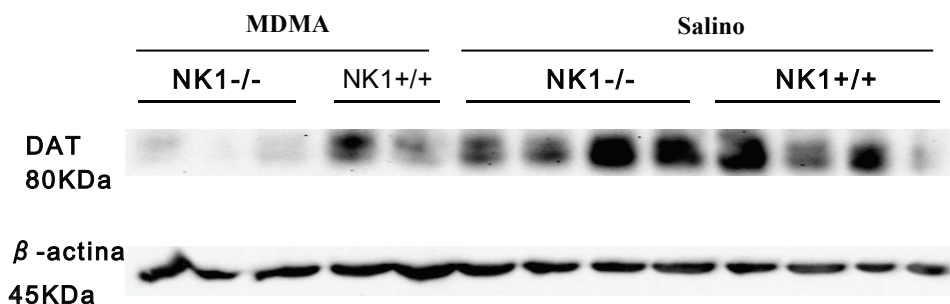
En la figura 7A se puede observar que el western blot reveló la banda para el DAT a 80 KDa y la correspondiente a la  $\beta$ -actina a 45 KDa, coincidiendo con lo previamente descrito por otros autores. La densidad óptica para DAT de cada una de las muestras fue normalizada dividiendo por su control de carga dado por la  $\beta$ -actina con el fin de corregir posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada en cada una de las calles del gel de poliacrilamida. Las membranas de western blot en estriado de los animales tratados con una dosis tóxica de MDMA muestran una clara depleción del DAT (Fig. 7A) comparado con las de los animales tratados con salino.

El análisis densitométrico del contenido proteico del DAT estriatal siete días después del tratamiento tóxico con MDMA (Fig. 7B) se realizó mediante el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. Este análisis mostró un efecto significativo de tratamiento (Wald  $\chi^2(1)= 20,213$ ;  $p<0,001$ ) y de genotipo (Wald  $\chi^2(1)= 6,857$ ;  $p<0,01$ ) pero no interacción tratamiento x genotipo.

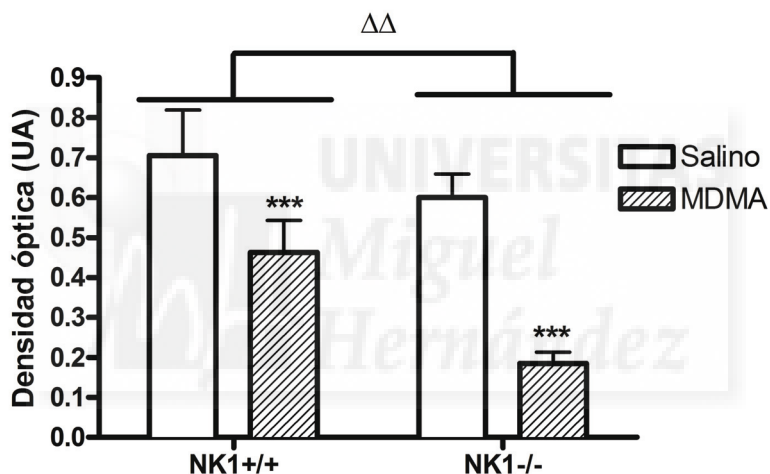
El análisis densitométrico de los niveles de proteína mostró una disminución significativa en el contenido del DAT en todos los animales tratados con MDMA, tanto silvestres como knockouts. Sin embargo, esta reducción es mayor en los animales mutantes que en los silvestres, siendo la disminución frente a sus respectivos controles del 34,4% en animales NK1+/+ y del 69,2% en animales NK1-/-.

Estos resultados mostraron que la ausencia del receptor NK1 no proporciona neuroprotección frente a la disminución del contenido estriatal del DAT inducido por el tratamiento tóxico con éxtasis, sino más bien todo lo contrario, incrementa la neurotoxicidad.

A.



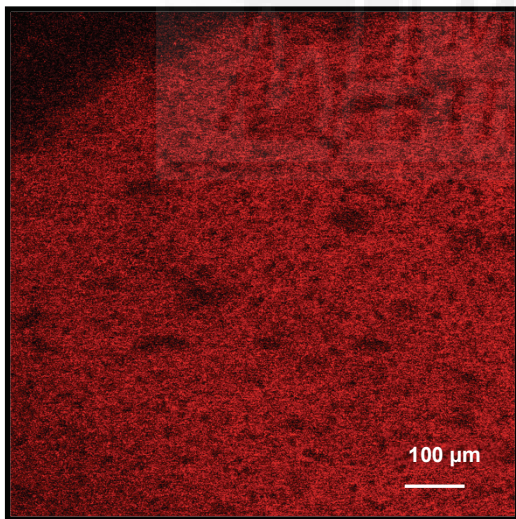
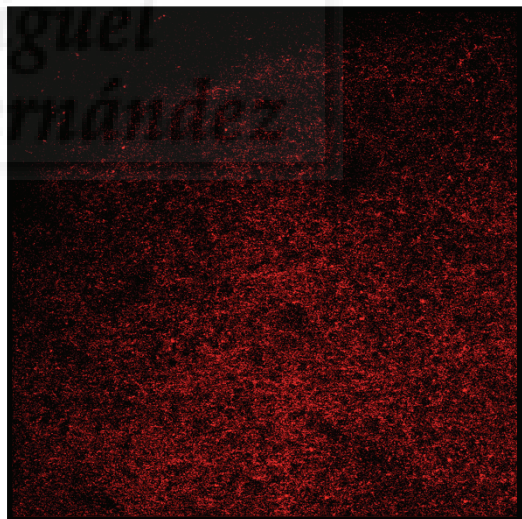
B.



**Figura 7. Western blot y cuantificación de la densidad óptica del DAT.** A) La banda de 80 KDa corresponde al DAT y la de 45 KDa a la  $\beta$ -actina. Cada calle corresponde al homogeneizado estriatal de un animal. B) Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de la densidad óptica, obtenida de las bandas de proteína del western blot, para cada grupo (n=5-7 por grupo). El análisis GzLM reveló efecto de tratamiento (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. grupo salino) y de genotipo ( $\Delta\Delta$   $p < 0,01$  NK1-/- vs. NK1+/+) sin embargo, no encontró interacción tratamiento x genotipo.

## 6. Estudio inmunohistoquímico de los efectos a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la expresión estriatal del DAT en animales NK1+/+ y NK1-/-

La expresión del DAT, un marcador inequívoco de terminales dopaminérgicas estriatales, se analizó por inmunofluorescencia siete días después del tratamiento tóxico con la droga. Los cortes coronales estriatales de ratones tratados con salino y MDMA son representados en las Fig. 8A y Fig. 8B, respectivamente. Las imágenes muestran una clara pérdida de la inmureactividad al DAT en los animales tratados tóxicamente con MDMA, indicando la existencia de neurotoxicidad. Sin embargo, esta disminución en la expresión del DAT en el cuerpo estriado fue similar en ambos genotipos. Por tanto podemos concluir que el tratamiento tóxico con MDMA induce degeneración de las terminales dopaminérgicas estriatales a largo plazo y, además cualitativamente no se observó neuroprotección alguna en animales carentes del receptor NK1.

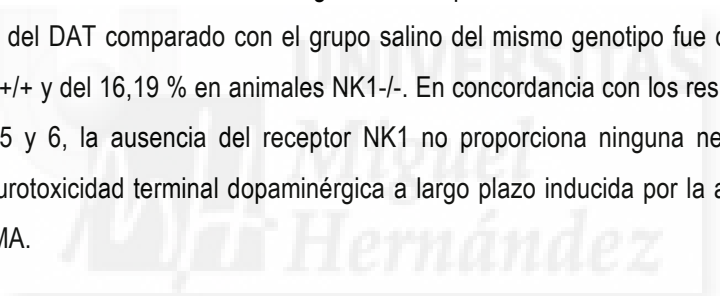
**A.****Salino****B.****MDMA**

**Figura 8.** Inmunofluorescencia estriatal del DAT siete días después del tratamiento tóxico con MDMA (3 x 25 mg/kg, i.p. a intervalos de 3 h) en animales NK1+/+ y NK1-/-. Imágenes de fluorescencia confocal a 20x.

## **7. Estudio autorradiográfico de los efectos a largo plazo de la administración tóxica de MDMA sobre la densidad estriatal del DAT en animales NK1+/+ y NK1-/-**

Los autorradiogramas de unión del radioligando [<sup>125</sup>I]RTI-121 en estriado de los animales tratados con una dosis tóxica de MDMA muestran una clara depleción del DAT (Fig. 9A) comparado con los animales tratados con salino, observándose los mayores déficits del DAT en la zona dorsolateral tanto de los animales NK1+/+ como NK1-/-.

El análisis de la densidad óptica del DAT en el estriado siete días después del tratamiento tóxico con MDMA (Fig. 9B) se realizó mediante el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. Este análisis mostró únicamente un efecto significativo de tratamiento (Wald  $\chi^2(1) = 20,184$ ;  $p < 0,001$ ). La cuantificación de los autorradiogramas mediante análisis de imagen indican que la reducción del contenido estriatal de los niveles del DAT comparado con el grupo salino del mismo genotipo fue del 9,14 % en animales NK1+/+ y del 16,19 % en animales NK1-/. En concordancia con los resultados de los apartados 4, 5 y 6, la ausencia del receptor NK1 no proporciona ninguna neuroprotección frente a la neurotoxicidad terminal dopaminérgica a largo plazo inducida por la administración tóxica de MDMA.



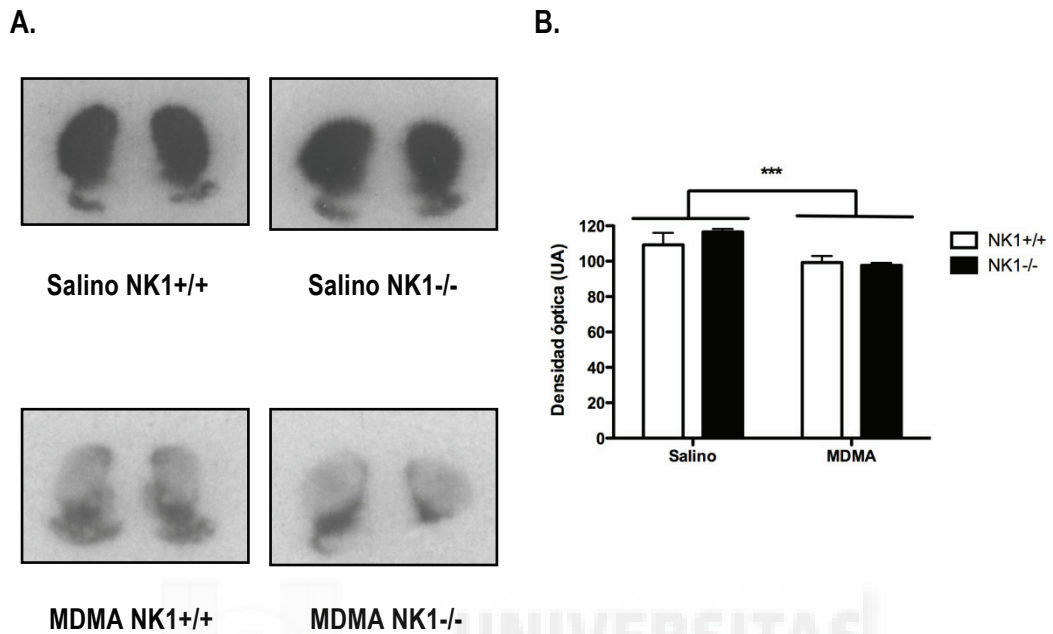
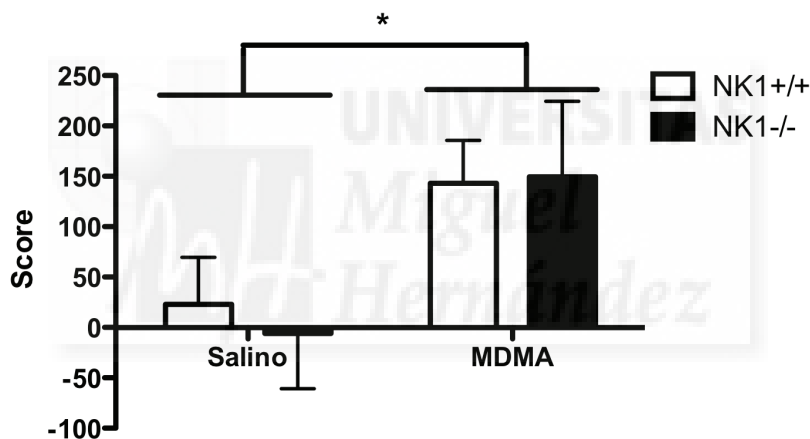


Figura 9. Autorradiogramas estriatales representativos de  $[^{125}\text{I}]\text{RTI-121}$  siete días después del tratamiento tóxico con MDMA (3 x 25 mg/kg, i.p. a intervalos de 3 h) en animales NK1+/+ y NK1-/- (9A). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM (n=4-6/grupo) de la densidad óptica del DAT (9B). El análisis GzLM reveló un efecto de tratamiento (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. grupo salino).

## 8. Preferencia de plaza condicionada inducida por MDMA

Las propiedades recompensantes del MDMA se estudiaron mediante el ensayo de CPP y, los resultados se analizaron utilizando el modelo lineal generalizado (GzLM) con el tratamiento y el genotipo como factores intersujetos. El análisis GzLM de los valores de score obtenidos en el CPP inducido por MDMA (Fig. 10) reveló únicamente un efecto significativo del tratamiento con MDMA (Wald  $\chi^2(1) = 4,554$ ;  $p < 0.05$ ). Este análisis mostró una preferencia de plaza inducida por MDMA tanto en animales NK1<sup>+/+</sup> como NK1<sup>-/-</sup>. Es decir, los efectos recompensantes inducidos por la MDMA son similares en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>, por lo que no parecen estar mediados por la SP.



**Figura 10. Preferencia de plaza condicionada inducida por MDMA (10 mg/kg i.p.) en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. ( $n=5-12$ /grupo) de los scores. El análisis GzLM no reveló efecto de genotipo ni interacción tratamiento x genotipo, sin embargo se encontró un efecto significativo de tratamiento (\*  $p < 0,05$  vs. grupo salino).

## DISCUSIÓN







## 1. Implicación de la SP en la hipertermia inducida por la administración tóxica de MDMA

En ratones la MDMA induce un incremento en la temperatura corporal, aunque esta respuesta hipertérmica depende tanto de la cepa empleada como de la dosis administrada en el estudio.

En un primer experimento quisimos estudiar los efectos de la administración tóxica de MDMA (3 x 25 mg/Kg i.p., a intervalos de 3 h) sobre la temperatura corporal y si la SP era capaz de modular la hipertermia inducida por la droga. Para ello se registró la temperatura rectal de ratones NK1<sup>-/-</sup> y NK1<sup>+/+</sup> tras cada una de las 3 inyecciones de MDMA. Como esperábamos, los resultados obtenidos muestran que la MDMA induce hipertermia en los animales NK1<sup>+/+</sup>, alcanzando el máximo incremento de temperatura 30 minutos después de cada inyección y siendo la magnitud de la respuesta superior tras la primera y la segunda inyección. Nuestros resultados están en concordancia con trabajos previos donde la MDMA induce un incremento en la temperatura rectal de aproximadamente 2°C utilizando la misma cepa de ratones, C57BL/6J, y protocolos de administración de MDMA similares: 4 x 20 mg/Kg s.c., a intervalos de 2h (Johnson, O'Callaghan, Miller 2002; Miller and O'Callaghan 1994; Reveron, Monks, Duvauchelle 2005) y 3 x 15 mg/kg i.p., a intervalos de 3h (Sanchez et al. 2003). Los ratones mutantes mostraron una respuesta hipertérmica similar a la de los silvestres excepto tras la primera inyección donde los ratones NK1<sup>-/-</sup> mostraron mayores incrementos en las temperaturas rectales inducidas por la droga que los NK1<sup>+/+</sup>. Algunos estudios sugieren que la hipertermia producida por la MDMA es debida a la liberación de dopamina. Mechan et al., (Mechan et al. 2002b) observaron que el antagonista del receptor de dopamina D<sub>1</sub>, DSCH 23390, es capaz de bloquear la hipertermia inducida por la MDMA. De acuerdo con estos estudios, podríamos explicar que esta mayor respuesta hipertérmica inicial en los ratones mutantes inducida por la droga podría ser debida al mayor contenido basal de DA en el estriado que hemos obtenido mediante HPLC en ratones NK1<sup>-/-</sup>. Lo descrito anteriormente podría conducir a un mayor incremento en la liberación de DA tras la primera inyección de MDMA produciendo así una mayor respuesta hipertérmica inicial. Trabajos previos de Yan TC. et al., (Yan, Hunt, Stanford 2009) usando microdiálisis *in vivo* no mostraron diferencias entre genotipos en el flujo basal de dopamina en el estriado dorsal de animales NK1; si bien es cierto que el fondo genético de los animales empleados en este trabajo (129/Sv x C57BL/6 cruzados

con una cepa no-congénita MF1) es distinto al utilizado en nuestros experimentos (NK1 backcross), lo cual podría explicar las diferencias en los niveles basales de DA estriatal.

En una segunda parte del experimento quisimos estudiar si los efectos del antagonista selectivo del receptor NK1 (RP67580) en animales silvestres, eran similares a los obtenidos previamente utilizando el ratón carente del receptor NK1<sup>-/-</sup>. Efectivamente, y en concordancia con los resultados obtenidos utilizando ratones NK1<sup>-/-</sup>, los resultados muestran que el pretratamiento con el antagonista RP67580 no produce un bloqueo de la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA. Estos resultados coinciden con los de Yu et al., (Yu, Cadet, Angulo 2002) en los que el antagonista del receptor NK1, WIN-51,708, no es capaz de bloquear la hipertermia inducida por la droga.

Cabe resaltar que nos resultó imposible realizar el estudio completo, a 7 horas y 3 inyecciones de MDMA, del efecto del pretratamiento con el antagonista RP67580 sobre la temperatura rectal debido a la mortalidad que producía en los ratones su coadministración. Transcurridas 3 horas de la primera inyección de MDMA los animales morían, creemos que por hipotermia, no pudiendo registrar lecturas de temperatura más allá de 3 horas desde el inicio del estudio. En un primer momento, quisimos utilizar el antagonista no peptídico del receptor NK1, WIN-51,708, ya que había sido utilizado en trabajos previos para estudiar el efecto de su coadministración con metanfetamina sobre la temperatura rectal en ratones (Yu, Cadet, Angulo 2002). Para ello, 30 min antes de la primera y tercera inyección de MDMA inyectamos una dosis de 7,5 mg/Kg i.p de WIN-51,708 (W-103, Sigma) diluido en una solución al 45% (p/v) de 2-hidroxipropil-β-cyclodextrin (H-5784, Sigma). Sin embargo, no fuimos capaces de finalizar estos experimentos debido a la mortalidad de los animales pertenecientes al grupo tratado con WIN-51,708 y MDMA, donde el 94% de los animales murió.

El conjunto de los datos refleja que en ningún caso la delección del receptor NK1 previene la hipertermia inducida por la MDMA. Debido a que la hipertermia ha sido estrechamente correlacionada con la neurotoxicidad (Ali, Newport, Slikker 1996; Tata, Raudensky, Yamamoto 2007), estos resultados podrían sugerir la ausencia de neuroprotección frente a la MDMA en los ratones NK1<sup>-/-</sup> debido a que estos ratones no son capaces de bloquear la respuesta hipertérmica inducida por esta droga. Sin embargo, estudios previos muestran que la hipertermia no siempre está correlacionada con la neurotoxicidad inducida por la MDMA.

O'Shea et al., (O'Shea et al. 2001) publicaron que los efectos neuroprotectores frente a la MDMA producidos por el pretratamiento con el antagonista del DAT, GBR 12909, no están relacionados con los cambios en la temperatura corporal, ya que este compuesto no modifica la temperatura rectal inducida por la droga. Por tanto, existe la posibilidad de que todavía seamos capaces de disociar, en ratones NK1-/-, entre los fenómenos de neurotoxicidad e hipertermia.

## **2. Implicación de la SP en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la administración tóxica de MDMA**

Se ha demostrado que la MDMA actúa como una potente neurotoxina, causando en el estriado de ratón neurodegeneración terminal dopaminérgica (Granado et al. 2008a; Granado et al. 2008b; Logan et al. 1988; O'Callaghan and Miller 1994). Este daño se refleja en el estriado por la reducción de la concentración de DA y sus metabolitos, los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y homovalínico (HVA), la disminución de la actividad de la tiroxina hidroxilasa (TH) y la reducción de la densidad estriatal del transportador de dopamina (DAT) (Granado et al. 2008a; O'Shea et al. 2001; Reveren, Monks, Duvauchelle 2005).

En este trabajo investigamos si la administración repetida de MDMA produce a largo plazo degeneración terminal dopaminérgica en el estriado de ratón y si animales carentes del receptor NK1 presentaban una menor neurotoxicidad frente a esta droga. Para ello se analizaron diversos marcadores dopaminérgicos de neurotoxicidad estriatal en ratones NK1-/- y NK1+/- siete días después el tratamiento tóxico con la droga.

En nuestros estudios hemos sido capaces de demostrar en ratones silvestres, tanto inmunohistoquímica como bioquímicamente, que la administración de dosis altas y repetidas de MDMA produce una clara neurodegeneración estriatal dopaminérgica a largo plazo (Granado et al. 2011; O'Shea et al. 2001). En el caso de los animales mutantes, los estudios de HPLC muestran una clara reducción de los niveles endógenos de DA, DOPAC y HVA siete días después del tratamiento tóxico con MDMA. En concordancia con estos resultados, tanto el análisis autorradiográfico de la densidad óptica del DAT como la cuantificación de esta proteína mediante western blot, mostraron en ambos genotipos una disminución similar de la densidad

estriatal del DAT, lo cual refleja la pérdida de fibras dopaminérgicas causada por los efectos neurotóxicos del éxtasis. Nuestros resultados confirman, a través de diferentes técnicas, que la ausencia del receptor NK1 no protege frente a la neurodegeneración terminal dopaminérgica en el estriado, por lo que la SP no parece estar implicada en la hipertermia ni en los efectos sobre estas neuronas estriatales.

Numerosos estudios han correlacionado la hipertermia inducida por la MDMA con la neurotoxicidad (Malberg and Seiden 1998; Tata, Raudensky, Yamamoto 2007), por lo que una posible explicación a la ausencia de neuroprotección frente al éxtasis en ratones NK1<sup>-/-</sup> podría ser su incapacidad para prevenir la hipertermia inducida por la droga. De hecho, hemos observado temperaturas rectales superiores en ratones NK1<sup>-/-</sup> después de la primera inyección de MDMA lo que se podría correlacionar con la mayor disminución en el contenido estriatal de DA (62,9 %), DOPAC (66,85 %) y HVA (56,69 %) en los ratones mutantes siete días después del tratamiento con la droga comparado con ratones silvestres (DA: 36,5 %, DOPAC: 38,05 % y HVA: 12,08 %). En el mismo sentido podríamos correlacionar la mayor respuesta hipertérmica de los ratones NK1<sup>-/-</sup>, en la primera parte del protocolo de administración tóxica de MDMA, con la mayor disminución encontrada en el contenido estriatal del DAT en animales NK1<sup>-/-</sup> tanto en el análisis autoradiográfico (16,19 % en NK1<sup>-/-</sup> vs. 9,14 % en NK1<sup>+/+</sup>) como en el western blot (69,2% en NK1<sup>-/-</sup> vs. 34,4% en NK1<sup>+/+</sup>).

Trabajos previos (Yu, Cadet, Angulo 2002; Yu et al. 2002) muestran que el antagonista selectivo del receptor NK1, WIN-51,708, es capaz de evitar la degeneración terminal dopaminérgica inducida por el psicoestimulante metanfetamina (METH). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la ausencia del receptor NK1 en los animales NK1<sup>-/-</sup> no proporciona neuroprotección frente a la neurodegeneración inducida por MDMA en ninguno de los marcadores dopaminérgicos estudiados.

La divergencia en los resultados obtenidos entre estos trabajos se podría explicar por la utilización de dos psicoestimulantes de tipo anfetamínico diferentes: METH y MDMA. A pesar que ambos son derivados de la anfetamina y comparten una estructura química básica que contribuye a sus acciones farmacológicas características (Sulzer et al. 2005), presentan diferencias: la METH presenta un grupo metilo unido al NH<sub>2</sub> de la cadena lateral y la MDMA, además de este grupo metilo, tiene un grupo metilén-dioxi unido al anillo aromático. Estas

diferencias estructurales hacen que las anfetaminas difieran en sus afinidades por los transportadores de monoaminas, interviniendo en diferentes vías de neurotransmisión (Teixeira-Gomes et al. 2015). Estudios en animales de experimentación sobre los mecanismos de acción farmacológicos muestran que la MDMA presenta mayor afinidad por el transportador de 5-HT (5-HTT) que sobre el de DA (DAT), causando una liberación superior de 5-HT que de DA y, la METH actúa con mayor potencia sobre la vía dopaminérgica produciendo una mayor liberación de DA (Rothman and Baumann 2003).

Los antagonistas empleados (WIN-51,708 vs. RP67580) también presentan claras diferencias que podrían explicar la divergencia en los resultados obtenidos. Tanto WIN-51,708 como RP67580 ( $K_i=2.9\text{nM}$  en rata y  $K_i= 2.7\text{nM}$  en ratón) (Beaujouan et al. 1993) son antagonistas no peptídicos del receptor NK1 con una elevada afinidad por el mismo (Sachais and Krause 1994). Esta selectividad es mucho mayor en WIN-51,708 que en RP67580 (Sachais and Krause 1994). Cabe resaltar que la afinidad de los antagonistas no peptídicos del receptor NK1 difieren entre especies, por ejemplo WIN-51,708 muestra una afinidad dramáticamente superior para el receptor NK1 de rata que para el receptor NK1 humano (Beaujouan et al. 1993) y el compuesto RP67580, muestra una elevada afinidad por el receptor NK1 de ratas y ratón pero no de humanos (Quartara, L.; Maggi, C.A. The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides*, 1997, 31, 537-63; Quartara, L.; Altamura, M. Tachykinin receptors antagonists: from research to clinic. 2006). Un trabajo publicado por Weir et al. (Weir et al. 2014) también muestra diferencias en los efectos de dos antagonistas distintos del receptor NK1 en la evaluación de la falta de atención e impulsividad en ratones NK1<sup>+/+</sup>; sus autores sugieren que estas diferencias farmacológicas podrían deberse a la distinta afinidad de estos antagonistas por los canales de calcio.

Tampoco podemos descartar que la discordancia en los resultados pueda deberse a diferencias en la susceptibilidad a la droga y/o al antagonista de la cepa empleada en el estudio. En nuestro estudio se emplearon ratones pertenecientes a la cepa congénita C57BL/6J backcross cuyo fondo genético es un 99,9% C57BL/6J y sin embargo, en los trabajos de Yu et al. (2002) se utilizaron animales de la cepa no-congénita CD1.

En oposición a nuestra hipótesis de partida, en la bibliografía encontramos numerosos trabajos que revelan acciones neuroprotectoras del receptor NK1 y sus agonistas. En modelos in vitro,

se ha demostrado que los agonistas del receptor NK1 ejercen un papel neurotrófico y neuroprotector para el sistema nervioso central y periférico (Lallemend et al. 2003; Salthun-Lassalle et al. 2005). Extrapolando a humanos, también se ha documentado una reducción de los niveles de SP en el cuerpo estriado y sustancia negra de los cerebros de pacientes parkinsonianos analizados post-mortem y en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Tenovuo, Rinne, Viljanen 1984; Tenovuo et al. 1990). Un trabajo más reciente de Chu et al. (Chu et al. 2011) muestra que el agonista del receptor NK1, [(Pyr6, Pro9)-SP (6-11)], protege las neuronas dopaminérgicas frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA tanto en modelos in vitro como in vivo.

### **3. Implicación de la SP en los efectos a largo plazo sobre la actividad locomotora y la ansiedad inducidos por la administración tóxica de MDMA**

Entre los efectos funcionales a largo plazo inducidos por la MDMA se han descrito alteraciones en la actividad locomotora. Se ha demostrado que ratas tratadas con un régimen de MDMA que produce una pérdida del 50% del contenido estriatal de serotonina muestran, siete días después, una reducción en la actividad locomotora tanto diurna como nocturna (Wallace, Gudelsky, Vorhees 2001).

Nosotros quisimos estudiar si la administración tóxica de MDMA producía a largo plazo alteraciones en la actividad locomotora y si la SP era capaz de modular estos efectos. Para ello se analizó la actividad locomotora espontánea en campo abierto de ratones NK1<sup>-/-</sup> y NK1<sup>+/+</sup> seis días después del tratamiento tóxico con la droga. Los resultados obtenidos en este ensayo no muestran cambios a largo plazo en la actividad locomotora espontánea en ninguno de los dos genotipos. McNamara mostró que la actividad locomotora de ratas tratadas con MDMA (5, 10, ó 20 mg/kg, 2 veces/día durante 4 días) volvía a los niveles basales 48 horas después del tratamiento con la droga (McNamara, Kelly, Leonard 1995). Por lo tanto, no resulta extraño que nuestros resultados no muestren alteraciones en la actividad locomotora 6 días después del tratamiento con la droga.

Por otra parte, la teoría psicoestimulante de la adicción (Wise and Bozarth 1987) asume que la mayoría de drogas adictivas son capaces de inducir activación locomotora. Esta asunción está

relacionada con la proposición de que todos los reforzadores positivos tienen un mecanismo neural común: el incremento de actividad en el circuito mesolímbico dopaminérgico. Apoyándonos en esta teoría, medimos la estimulación de la actividad locomotora horizontal aguda en campo abierto como biomarcador de los efectos recompensantes de la MDMA, siendo el incremento de la actividad locomotora inducido por MDMA (10 mg/kg i.p.) similar en animales NK1<sup>-/-</sup> y NK1<sup>+/+</sup>.

Estudios previos han implicado a la SP en diversos procesos fisiopatológicos incluyendo la ansiedad, la depresión, la agresión y el estrés (De Felipe et al. 1998; Kramer, Poblete, Azmitia 1998; Rupniak and Kramer 1999; Santarelli et al. 2002). Además, la SP y su receptor preferencial están altamente expresados en áreas del cerebro implicadas en la regulación de la respuesta al estrés y la ansiedad como la amígdala, el núcleo accumbens, el hipocampo, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal (Arai and Emson 1986; Mantyh, Maggio, Hunt 1984). Los estímulos estresantes producen un incremento en la liberación de SP en determinadas estructuras límbicas como la amígdala, cuya magnitud depende de la magnitud del estímulo. Este incremento en la concentración de SP tiene efectos ansiogénicos, mientras que el bloqueo del receptor NK1 reduce la ansiedad (Bassi et al. 2007a; Bassi et al. 2007b; File 1997). Sin embargo, aunque los efectos anteriores son bastante consistentes, hay trabajos que sugieren la existencia de diferencias regionales en el efecto de la SP; Carvalho et al., encontraron que la SP tenía efectos ansiolíticos cuando era inyectada en el hipocampo dorsal mientras que su inyección en el hipocampo ventral carecía de efectos sobre la ansiedad (Carvalho et al. 2008).

Basándonos en las conclusiones anteriores quisimos estudiar si la SP es capaz de modular los efectos a largo plazo sobre los niveles de ansiedad inducidos por la administración tóxica de MDMA. Para ello se estudió el comportamiento de ratones carentes del receptor NK1 en el ensayo de luz-oscuridad seis días después del tratamiento tóxico con la droga. Los resultados obtenidos en este ensayo muestran un leve efecto ansiogénico, tanto en animales NK1<sup>-/-</sup> como NK1<sup>+/+</sup>, debido al tratamiento tóxico con MDMA.

Estos persistentes efectos ansiogénicos ya han sido obtenidos con anterioridad en numerosos trabajos (Fone et al. 2002; Gurtman et al. 2002; Marston et al. 1999). Morley et al., mostraron resultados consistentes en rata obteniendo, en diferentes tests de ansiedad, un efecto

ansiogénico tres meses después del tratamiento con dosis moderadas y altas de MDMA (Morley et al. 2001).

Estos resultados tienen especial interés debido a que estudios recientes sugieren que el consumo recreativo de éxtasis en humanos también produce un aumento en los niveles ansiedad (Parrott, Sisk, Turner 2000; Verkes et al. 2001).

#### **4. Implicación de la SP en los efectos recompensantes de la MDMA**

La administración intracerebral (i.c.) de SP produce efectos recompensantes (Huston et al. 1993; Nikolaus, Huston, Hasenohrl 1999), e incrementa la actividad locomotora (Elliott and Iversen 1986), por lo que la SP participa en los mecanismos recompensantes y motivacionales. Además, el receptor NK1 (receptor preferencial de la SP) está altamente expresado en áreas cerebrales del sistema de recompensa donde se median las propiedades motivacionales tanto de los reforzantes naturales como de las drogas de abuso (Gadd et al. 2003; Murtra et al. 2000; Nakaya et al. 1994).

Por otra parte, la MDMA incrementa la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Kankaanpaa et al. 1998; Marona-Lewicka et al. 1996; White et al. 1996) aumentando la actividad del circuito mesolímbico dopaminérgico lo que parece estar implicado en sus propiedades recompensantes (Bilsky et al. 1998).

Basándonos en estas dos premisas quisimos estudiar si la SP, actuando a través de su receptor NK1, modula los efectos recompensantes de la MDMA. Para ello se estudiaron los efectos recompensantes de la MDMA en animales carentes del receptor NK1 mediante el ensayo de CPP.

Los resultados obtenidos en el ensayo de preferencia de plaza condicionada, apoyados por los de la actividad locomotora aguda inducida por MDMA ya descritos en el apartado anterior, mostraron que ambos genotipos desarrollan similares efectos recompensantes a elevadas dosis de MDMA (10 mg/kg i.p.).

Estos resultados concuerdan con estudios previos del grupo demostrando que la ausencia de los efectos recompensantes en los ratones NK1<sup>-/-</sup> es específica para los opiáceos (Murtra et al. 2000), ya que los animales mutantes muestran en el ensayo de CPP efectos recompensantes



comparables a los silvestres para la cocaína, droga psicoestimulante como la MDMA. Esta disociación en las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes, cocaína y MDMA, y de los opiáceos podría deberse a que están mediadas por distintos mecanismos cerebrales (Koob and Le Moal 1997; Koob, Sanna, Bloom 1998; Wise 1996).





## CONCLUSIONES





1. La administración de MDMA induce incrementos similares en la temperatura rectal tanto de animales mutantes como silvestres, concluyendo que la sustancia P no modula la hipertermia inducida por la droga.
2. El pretratamiento con el antagonista selectivo del receptor NK1, RP67580, no bloquea la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA.
3. La ausencia del receptor NK1 no proporciona neuroprotección frente a la neurotoxicidad terminal dopaminérgica inducida por MDMA.
4. La administración tóxica de MDMA no produce alteraciones a largo plazo en la actividad locomotora en animales NK1<sup>-/-</sup> ni en NK1<sup>+/+</sup>.
5. El tratamiento tóxico con MDMA produce efectos ansiogénicos persistentes tanto en animales NK1<sup>-/-</sup> como NK1<sup>+/+</sup>, por lo que la SP no es capaz de modular los efectos a largo plazo sobre los niveles de ansiedad inducidos por la administración tóxica de esta droga.
6. La MDMA produce efectos recompensantes similares en animales NK1<sup>-/-</sup> y NK1<sup>+/+</sup>, por lo tanto las propiedades recompensantes de esta droga no parecen estar mediadas por la SP.
7. Los antagonistas del receptor NK1 posiblemente no ofrezcan ventajas terapéuticas frente a la neurotoxicidad inducida por derivados anfetamínicos.



CAPÍTULO III. RESPUESTA ADRENOCORTICAL Y  
COMPORTAMENTAL AL ESTRÉS CRÓNICO POR  
INMOBILIZACIÓN EN RATONES NK1-/-

*M. J. Hernández*





## **ADRENOCORTICAL AND BEHAVIOURAL RESPONSE TO CHRONIC RESTRAINT STRESS IN NEUROKININ-1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE**

### **Abstract**

Brain substance P and its receptor (neurokinin-1, NK1) have a widespread brain distribution and are involved in an important number of behavioural and physiological responses to emotional stimuli. However, the role of NK1 receptors in the consequences of exposure to chronic stress has not been explored. The present study focused on the role of these receptors in the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) response to daily repeated restraint stress (evaluated by plasma corticosterone levels), as well as on the effect of this procedure on anxietylike behaviour, spatial learning and memory in the Morris water maze (MWM), a hippocampus-dependent task. Adult null mutant NK1<sup>-/-</sup> mice, with a C57BL/6J background, and the corresponding wild-type mice showed similar resting corticosterone levels and, also, did not differ in corticosterone response to a first restraint. Nevertheless, adaptation to the repeated stressor was faster in NK1<sup>-/-</sup> mice. Chronic restraint modestly increased anxiety-like behaviour in the light–dark test, irrespective of genotype. Throughout the days of the MWM trials, NK1<sup>-/-</sup> mice showed a similar learning rate to that of wild-type mice, but had lower levels of thigmotaxis and showed a better retention in the probe trial. Chronic restraint stress did not affect these variables in either genotype. These results indicate that deletion of the NK1 receptor does not alter behavioural susceptibility to chronic repeated stress in mice, but accelerates adaptation of the HPA axis. In addition, deletion may result in lower levels of thigmotaxis and improved short-term spatial memory, perhaps reflecting a better learning strategy in the MWM.

## Conclusions

1. Basal plasma corticosterone levels and its response to acute stress induced by restraint are similar in animals NK1 +/+ and NK1-/. However, the habituation of the response, as a measure of the adaptation speed of the HPA axis in response to repeated exposure to this stressor, is greater in animals NK1-/-; this may indicate that the activation of the receptor NK1 is involved in the maintenance of this response, delaying the habituation of the HPA axis.
2. Exposure to chronic immobilization stress produces a slight increase in anxiety, evaluated by light-dark box test, in both NK1-/- and NK1 +/+ mice.
3. In none of the two genotypes chronic restraint induced alterations in learning and memory, evaluated by the MWM. Although animals NK1-/- show a greater short-term memory in some of the parameters evaluated. This could suggest that the lack of NK1 receptor increases short-term retention and the development of more effective learning strategies.

The image features a large, faint watermark of a university logo in the center. The logo consists of a stylized 'U' and 'M' intertwined, with the text 'UNIVERSITAS Miguel Hernández' below it. A dark grey horizontal bar with rounded ends is superimposed over the center of the page, partially overlapping the watermark.

## INTRODUCCIÓN



## 1. Concepto de estrés

El concepto moderno de estrés tiene su origen a finales del siglo XIX cuando Walter Cannon propuso el término de “homeostasis”, rescatando el concepto de “Milieu Interieur” enunciado por Claude Bernard, definiéndolo como el conjunto de mecanismos por los que los organismos consiguen el mantenimiento del equilibrio fisiológico interno frente a los cambios del ambiente (Goldstein and McEwen 2002). Cannon propuso que el sistema simpático-médulo-adrenal (SMA) reacciona ante situaciones de emergencia produciendo ajustes que mantienen el “Milieu Interieur”. Cannon utilizaba el término estrés para referirse a agentes adversos del medio ambiente que alejan a los organismos del equilibrio homeostático y que, por lo tanto, generan respuestas compensatorias para restablecerlo.

Sin embargo, fue el endocrinólogo Hans Selye quien en 1936 popularizó el término de estrés definiéndolo como “Síndrome de estrés” o “Síndrome de adaptación general”. Selye denominó “stress” a la respuesta estereotipada de los organismos frente a cualquier estímulo estresante y “stressor” al estímulo capaz de alejar al individuo de su equilibrio homeostático (Pacak and Palkovits 2001). En el presente trabajo distinguiremos entre estímulo estresante (estresor), estrés (estado del organismo) y respuesta de estrés (Armario 2006).

La definición de estrés propuesta por Selye ha evolucionado mucho a lo largo del tiempo. Las contribuciones de diferentes autores como Mason, Weiss y McEwen han redefinido y ampliado el concepto, aportando un componente de especificidad de la respuesta de estrés en función de la naturaleza del estímulo estresante y aceptando la existencia de estímulos estresantes de tipo emocional (Levine 1985; Pacak et al. 1998; Romero and Sapolsky 1996). Actualmente se acepta que la respuesta de estrés presenta un componente no específico frente a cualquier tipo de estímulo estresante y otro específico dependiente de la naturaleza del mismo. De esta manera cada estímulo estresante presenta características cuantitativas, en referencia a la magnitud de la respuesta fisiológica que produce, y cualitativas distintas, activando diferentes áreas del Sistema Nervioso Central (SNC) (Pacak et al. 1998; Pacak and Palkovits 2001; Romero and Sapolsky 1996).

Aunque no existe una definición de estrés universalmente aceptada, nuestros estudios están enmarcados bajo la definición propuesta por Vigas (Vigas 1984): “Se entiende por estrés la respuesta del organismo debida a la exposición a agentes que pueden alterar, real o

simbólicamente, su integridad y a los que no puede hacer frente mediante los mecanismos homeostáticos normales”.

De la definición de Vigas se adivina la existencia de dos grandes categorías de estímulos estresantes las cuales están aceptadas en la actualidad (Herman et al. 2003; Pacak and Palkovits 2001): estímulos estresantes de naturaleza emocional (también denominados anticipatorios o procesativos) y estímulos estresantes de naturaleza física o sistémica (también denominados reactivos). Sin embargo, determinados estímulos estresantes no se pueden asignar en exclusiva a una de estas categorías ya que presentan un perfil mixto. Los estímulos sistémicos son aquellos que provocan perturbaciones directas en la homeostasis que se reflejan en parámetros fisiológicos (infecciones, alteraciones metabólicas u osmóticas, hipoxia, hemorragia, algunos estímulos físicos, los estímulos químicos y la mayoría de los farmacológicos). Estos estímulos activan la respuesta de estrés a través de mecanismos reflejos que no requieren activación emocional. Sin embargo, los estímulos estresantes de naturaleza emocional no constituyen una amenaza directa sino tan sólo potencial para el equilibrio homeostático y requieren activación emocional. Se incluyen dentro de esta categoría las situaciones estresantes de tipo social (derrota social, aislamiento y privación maternal) y otras situaciones fundamentalmente emocionales aunque con un componente físico (exposición al choque eléctrico, nado forzado e inmovilización). Los efectos estresantes de la mayoría de estos estímulos mixtos se deben principalmente a la activación emocional que los acompaña.

La respuesta al estrés, como proceso de adaptación positiva, incluye cambios fisiológicos y conductuales que permiten afrontar situaciones amenazantes. La respuesta de estrés es crucial para la supervivencia del individuo pero si la respuesta es exagerada, inadecuada o persistente puede desencadenar alteraciones fisiológicas y psicológicas: hipertensión (Stephoe, Kearsley, Walters 1993), desórdenes del sueño (Kant et al. 1995), trastornos de ansiedad, predisposición al consumo de drogas (Piazza and Le Moal 1997) y neurodegeneración (Sapolsky, Stein-Behrens, Armanini 1991).

La respuesta al estrés induce la activación tanto del eje SMA, que produce un aumento en la frecuencia cardíaca y la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo, como del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) que da lugar a la liberación de glucocorticoides a la

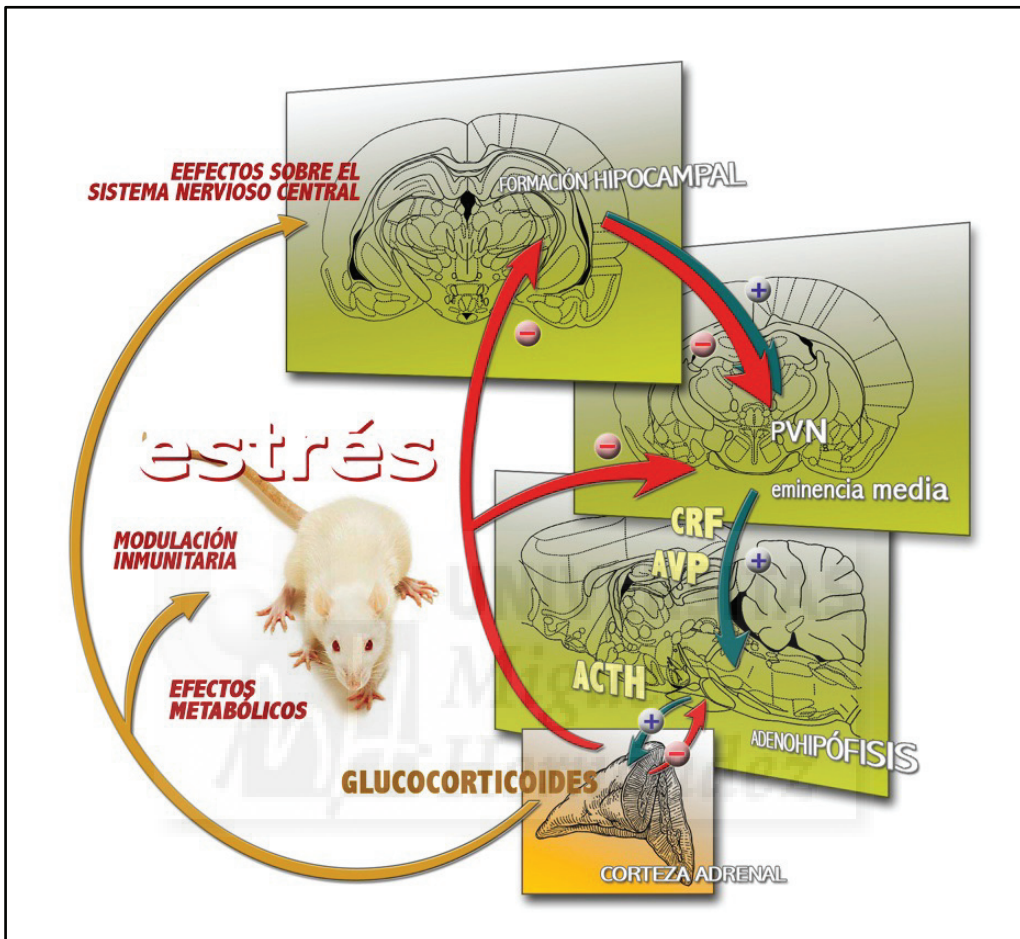
circulación. Estas reacciones pueden disociarse, de forma que la activación del eje SMA se produce preferentemente ante situaciones donde el organismo necesita una conducta más activa, mientras que la activación del eje HPA se da en situaciones que producen inseguridad bien por la novedad del estímulo, la ausencia de control sobre ellas o el incumplimiento de las expectativas.

## **2. El eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal**

El eje HPA tiene una función decisiva en las consecuencias físico y psicopatológicas derivadas de la exposición a situaciones de estrés.

Los estímulos estresantes activan diferentes vías del SNC en función de sus características. En general, los estímulos emocionales son procesados en primer lugar por estructuras encefálicas superiores que a través de diferentes núcleos límbicos activan el núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico, mientras que los estímulos sistémicos actúan sobre el PVN por vías más directas procedentes del tronco encefálico o áreas circunventriculares (Herman and Cullinan 1997). Sin embargo, independientemente del tipo de estímulo estresante la información converge en una población de neuronas parvocelulares neurosecretoras del PVN (región parvocelular, pPVN), donde se origina la cascada de activación del eje HPA. Las neuronas ubicadas en esta región sintetizan el factor liberador de corticotropina (CRF), lo transportan a través de sus axones hasta la zona externa de la eminencia media y lo liberan, junto a otros neuropéptidos como la arginina-vasopresina (AVP), a la circulación portal hipofisiaria para alcanzar la adenohipófisis. Allí, el CRF induce la síntesis de proopiomelanocortina (POMC) y la liberación a la circulación de diversos péptidos derivados de la misma como la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH actúa sobre la corteza adrenal estimulando la síntesis y secreción de glucocorticoides que regulan la actividad del eje HPA mediante mecanismos de retroinhibición sobre la hipófisis, el hipotálamo y estructuras suprahipotálamicas como la formación hipocampal y la corteza prefrontal medial (de Kloet 2003). En la Figura 1 se pueden observar los principales componentes y el mecanismo general de funcionamiento del eje HPA.

Figura I. Esquema general de funcionamiento del eje HPA



Delgado-Morales R.

### 3. Factores liberadores de ACTH: CRF y AVP

En 1981, Vale y colaboradores aislaron y caracterizaron un péptido liberador de ACTH que fue denominado factor liberador de corticotropina (CRF). A partir de ese momento, la función del CRF en el control de la respuesta al estrés ha sido ampliamente estudiada demostrándose que es una hormona clave en la iniciación de dicha respuesta.

El CRF presenta una amplia distribución cerebral por lo que se le atribuyen diferentes funciones dependiendo del sistema en el que actúe. El CRF liberado por las neuronas del PVN



resulta esencial en la iniciación de la respuesta del eje HPA, induciendo la síntesis y liberación de ACTH a la circulación. Las neuronas que expresan CRF localizadas en áreas del telencéfalo basal (amígdala central, núcleo del lecho de la estría terminal) o tronco encefálico (núcleo de Barrington, algunas zonas de los núcleos del rafe) están implicadas en la regulación de respuestas conductuales y autonómicas al estrés como alteraciones en la ansiedad, ingesta de comida, *arousal*, aprendizaje y memoria (Dunn and Berridge 1990; Owens and Nemeroff 1991). Existen neuronas que expresan CRF en diferentes áreas de la corteza cerebral y en la formación hipocampal cuya función es desconocida (Champagne, Beaulieu, Drolet 1998; Croiset, Nijsen, KampHuis 2000).

El CRF actúa a través de dos tipos de receptores acoplados a proteína G: CRFR<sub>1</sub> y CRFR<sub>2</sub> (Dautzenberg, Braun, Hauger 2001). La activación de estos receptores provoca un aumento del AMP cíclico intracelular (AMPC), la consecuente activación de la proteína quinasa A (PKA) y fosforilación de proteínas que conducen a la síntesis de promiomelacortina (POMC) y por tanto de ACTH. El CRF además de estimular la síntesis de ACTH también induce su liberación a la circulación (Rivier, Rivier, Vale 1982).

Un segundo péptido con una importante actividad hipofisiaria es la AVP. Se sintetiza fundamentalmente en neuronas magnocelulares y parvocelulares del PVN y en las magnocelulares del núcleo supraóptico.

La AVP no estimula la síntesis de ACTH y de forma directa ejerce un débil efecto sobre su liberación. Sin embargo, indirectamente puede actuar sobre la liberación de ACTH potenciando los efectos del CRF (Rivier and Vale 1983).

La AVP ejerce sus efectos a través de tres tipos de receptores acoplados a proteína G: V1a, V1b (asociados a la activación de fosfolipasas) y V2 (acoplado a la activación de la adenilato ciclasa) (Birnbaumer 2000; Itoi et al. 2004). Los receptores V1b (también denominado V3) desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta del eje HPA y se expresan en las células corticotropas de la hipófisis. Aunque existe controversia al respecto, se ha sugerido que la AVP podría contribuir a mantener la respuesta de la ACTH en situaciones de estrés crónico, ya que la exposición a estrés prolongado o crónico produce un aumento en el número de neuronas que expresan AVP en el PVN (Aguilera, PHam, Rabadan-Diehl 1994; Makara, Mergl, Zelena 2004).

#### 4. Hormonas periféricas: ACTH y glucocorticoides

Se ha descrito la síntesis y secreción de ACTH ante una amplia gama de situaciones estresantes, por lo que es considerada como la hormona periférica primaria en respuesta al estrés. La ACTH es un péptido de 30 aminoácidos derivado de la POMC cuya síntesis y liberación es inducida en la adenohipófisis por el CRF. Una vez en la circulación sanguínea, la ACTH actúa principalmente sobre la corteza de la glándula adrenal estimulando la síntesis y liberación de glucocorticoides (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en roedores). Esta acción la lleva a cabo actuando a través de receptores de membrana de melanocortinas tipo 2 (MC2-R) localizados casi exclusivamente en la corteza adrenal (Cone et al. 1993). La unión de la ACTH a su receptor produce la activación de la adenilato ciclasa, con el consecuente aumento del AMPc intracelular y la activación de la PKA, así como de otras vías intracelulares ligadas al  $Ca^{2+}$  (Gallo-Payet and Payet 2003). Esta activación de la PKA produce por un lado, la formación de la corticosterona (CORT) y por otro, modificaciones transcripcionales en las células adrenales que conducen a cambios más complejos y duraderos reflejados en sus efectos tróficos (Sewer and Waterman 2003).

Aunque la ACTH es el principal factor por el cual se promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides, se ha propuesto la existencia de otros factores que actúan sobre el control de la secreción de glucocorticoides en respuesta al estrés. Entre estos factores encontramos la regulación neural de la corteza adrenal (Engeland and Arnhold 2005), moléculas como la angiotensina II que produce incrementos en los niveles de corticosterona sin afectar a los niveles de ACTH (Keller-Wood et al. 1986) y, algunas citoquinas como la interleuquina 1 que actúa directamente sobre la glándula adrenal (Vinson, Hinson, Toth 1994).

La corteza de la glándula adrenal se divide en tres partes. La capa más externa, es la zona glomerular, ocupa un 10-15% de la corteza adrenal y libera mineralocorticoides; mientras que la capa intermedia, denominada fasciculada, representa el 75-80% de la corteza y es la responsable de la síntesis y liberación de los glucocorticoides. Los glucocorticoides son las principales moléculas efectoras del eje y realizan numerosas funciones en el organismo que están agrupadas en dos categorías: a) moduladoras y b) preparatorias (Sapolsky, Romero, Munck 2000).

- a) Las acciones moduladoras de los glucocorticoides alteran la respuesta del organismo ante una situación estresante y se subclasifican en:
- ✓ Permisivas. Son ejercidas por los glucocorticoides presentes antes del estímulo estresor, se dan al inicio de la respuesta de estrés y preparan los mecanismos de defensa del organismo para hacer frente a la situación estresante (por ejemplo, los efectos sobre el sistema cardiovascular).
  - ✓ Supresoras. Se producen por el aumento de los niveles de glucocorticoides inducido por estrés, por lo que se inician, al menos, una hora después del comienzo de la situación estresante y previenen al organismo de las consecuencias negativas de una respuesta exagerada (por ejemplo, inhibición de la respuesta inmune e inflamatoria y de la actividad del propio eje HPA mediante mecanismos de retroinhibición negativa).
  - ✓ Estimuladoras. Siguen el mismo patrón temporal que las acciones supresoras y también dependen de la magnitud de respuesta al estrés de los glucocorticoides. Sin embargo, potencian los efectos de otras hormonas liberadas durante la respuesta al estrés (por ejemplo, potenciación de la gluconeogénesis mediada por la liberación de adrenalina).
- b) Las acciones preparatorias de los glucocorticoides modulan futuras respuestas del organismo al estrés, aspecto muy importante en el estudio del estrés crónico.

Los glucocorticoides actúan a nivel genómico mediante su unión a dos tipos de receptores intracelulares: tipo I (o mineralocorticoides, MRs) y tipo II (o glucocorticoides, GRs) (Reul and de Kloet 1985). Ambos tipos de receptores presentan un dominio de unión a esteroides y otro de unión al ADN (Pratt 1993). El reconocimiento del ligando por el receptor forma una unidad funcional capaz de translocarse al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN e induce la transcripción de genes que tienen en su región promotora elementos de respuesta a glucocorticoides. Los MRs y los GRs presentan características diferenciales entre ellos como el grado de afinidad por determinados ligandos, su distribución y sus funciones en la regulación de la respuesta del eje HPA (de Kloet, Reul, Sutanto 1990).

Los glucocorticoides son capaces de inhibir la activación del eje HPA en respuesta al estrés mediante sus mecanismos de retroalimentación negativa. En función de la velocidad de acción

y del tipo de receptor implicado se han propuesto dos tipos básicos de mecanismos de retroinhibición: rápido y lento (Keller-Wood and Dallman 1984). La retroinhibición rápida es dependiente de la tasa de incremento de glucocorticoides en sangre y es de acción inmediata, por lo que es incompatible con el tiempo requerido para que se produzca la transcripción génica mediada por los receptores MRs y GRs. Se ha propuesto la existencia de unos receptores de membrana que median estos efectos rápidos de los glucocorticoides, aunque aún no han sido caracterizados (Makara and Haller 2001). Por otro lado, la retroinhibición lenta depende de los niveles plasmáticos de glucocorticoides en el periodo precedente a la exposición al estrés y es de acción lenta, iniciándose aproximadamente una hora después del inicio de la situación estresante. Este mecanismo está mediado por receptores de MRs y GRs e implica mecanismos de regulación génica como el bloqueo de la transcripción de los genes de CRF, AVP y POMC.

La retroinhibición de los glucocorticoides sobre el eje HPA tiene lugar a diferentes niveles anatómicos, que incluyen la adenohipófisis, el PVN y otras regiones extrahipotalámicas como la corteza prefrontal medial o la formación hipocampal (Armario 2006). En determinadas ocasiones la exposición a un estímulo estresante no bloquea la respuesta del eje HPA frente a presentaciones posteriores, lo cual lleva a pensar que la retroinhibición negativa debida a los glucocorticoides no es siempre efectiva. Por este motivo, Dallman y Jones (Dallman and Jones 1973) propusieron que la exposición a una situación estresante induce sensibilización a nivel del SNC frente a posteriores exposiciones al estrés, compensándose la retroinhibición negativa ejercida por los glucocorticoides y manteniéndose la capacidad de respuesta del eje.

Otro parámetro importante en la regulación de los efectos de los glucocorticoides en el organismo es la transcortina o globulina de unión a corticosteroides (CBG). En condiciones basales, una alta proporción de los glucocorticoides presentes en la circulación se encuentran unidos a la CBG, siendo así la hormona incapaz de unirse al receptor (Breuner and Orchinik 2002). Sin embargo, ante una situación de estrés los niveles de glucocorticoides libres se incrementan, siendo éstos los únicos capaces de unirse a los receptores celulares y ejercer su función biológica. Este parámetro se debe tener en cuenta, ya que aunque los niveles sanguíneos totales de glucocorticoides no varíen, los niveles de CBG pueden dar lugar a cambios en la fracción libre.

## 5. Respuesta al estrés del eje HPA

### 5.1. Curso temporal del eje

La exposición aguda al estrés produce cambios en todos los niveles del eje HPA, siendo fundamental conocer su dinámica temporal. A los 5 min de haberse iniciado el estímulo estresante se detecta un aumento de la expresión del gen que codifica para el CRF (Kovacs and Sawchenko 1996). La dinámica temporal de la AVP es más lenta, alcanzando su punto máximo aproximadamente una hora después del comienzo del estrés (Kovacs and Sawchenko 1996). La exposición a estímulos estresantes también produce una rápida liberación de ACTH, observable a partir de los 5 min del inicio de la exposición. Si la exposición al estrés persiste, se alcanza la máxima liberación de ACTH a los 15 min de su inicio manteniéndose entre 30 y 60 minutos (Garcia et al. 2000). Aunque el estímulo persista, transcurrida una hora los niveles plasmáticos de ACTH comienzan a descender de forma paulatina alcanzando niveles próximos a los basales entre las 10 y las 24 h, incluso en la exposición a estímulos estresantes severos (Hauger et al. 1988; Kant et al. 1987). Por tanto, los niveles plasmáticos de ACTH transcurridos 60 min desde el comienzo de la exposición no son un buen marcador de la intensidad del estrés. La causa de esta disminución progresiva no está clara, se asocia por un lado con la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides y por otro con la imposibilidad de las células corticotropas para mantener una elevada liberación de ACTH durante un tiempo tan prolongado (Marti, Andres, Armario 1999; Rivier and Vale 1987).

En lo que se refiere a la determinación de la liberación de corticosterona debe realizarse, con estímulos estresantes breves, a los 15-20 min desde el inicio de la exposición al estímulo que es el tiempo requerido por la corteza adrenal para alcanzar el máximo nivel de síntesis de corticosterona y, con estímulos de 15 min o más, el máximo de corticosterona se alcanza a los 30-60 min del inicio (Dal-Zotto et al. 2004; Levin, Blum, Roberts 1989). En muchas ocasiones los niveles de glucocorticoides no reflejan los niveles de ACTH, ya que la capacidad de la glándula adrenal se satura a niveles de ACTH relativamente bajos (Kant et al. 1983; Keller-Wood and Dallman 1984). Además, cuando la exposición al estímulo estresante es

prolongada los niveles de ACTH disminuyen progresivamente, hecho que no se observa en los niveles plasmáticos de corticosterona.

## 5.2. Efectos de la intensidad del estímulo

Las respuestas fisiológicas y, en ocasiones, las consecuencias patológicas de la exposición a estímulos estresantes están condicionadas por la intensidad de los mismos, independientemente de su naturaleza. Por lo tanto, resulta relevante conocer qué respuestas son proporcionales a la intensidad de los estímulos estresantes.

Existen numerosas variables fisiológicas que responden ante la exposición a estímulos estresantes aunque sólo unas pocas son sensibles a su intensidad. Armario et al. (Armario et al. 1986) observaron que en ratas expuestas de forma progresiva a estímulos estresantes los niveles plasmáticos de corticosterona y prolactina se correlacionaban positivamente con la intensidad de la situación estresante, mientras que otras hormonas hipofisarias (como la hormona luteinizante o la hormona estimulante de tiroides) no reflejaban la intensidad de la situación de estrés. Por tanto, es preciso diferenciar entre los conceptos de marcador de estrés, que define a aquella variable que es sensible al estrés y, marcador de intensidad de estrés, que hace referencia a aquella variable que responde proporcionalmente a la intensidad del estrés. Son considerados buenos marcadores de intensidad de estrés los niveles plasmáticos de catecolaminas (especialmente la adrenalina), los de glucosa (índice indirecto de la liberación de adrenalina), prolactina y hormonas del eje HPA (Marti and Armario 1998).

La validez de las hormonas del eje HPA en la evaluación de la intensidad de las situaciones estresantes es aplicable tanto a estímulos de tipo emocional como de tipo sistémico (Pacak and Palkovits 2001). Los niveles plasmáticos de corticosterona es el marcador de intensidad de estrés más comúnmente utilizado y sin embargo, sólo debería utilizarse en situaciones estresantes de intensidad baja o moderada (Kant et al. 1983) ya que presenta efecto techo. Una alternativa para su utilización como marcador de la intensidad de estrés es evaluar el curso temporal de los

niveles plasmáticos de corticosterona una vez terminada la exposición a estrés, ya que la velocidad de recuperación del eje HPA permite discriminar la intensidad del estímulo estresante (Marquez, Belda, Armario 2002).

### **5.3. Estrés crónico y adaptación del eje HPA**

Las consecuencias fisiológicas y comportamentales inducidas por la exposición a un determinado estímulo estresante dependen del tipo de estímulo, de su intensidad y duración.

Cuando la duración de la exposición a una situación estresante es de días o incluso semanas se considera estrés crónico (Marti and Armario 1998). Además, dentro del estrés crónico se puede distinguir entre continuo e intermitente. Aunque ambos tipos de estrés crónico se producen a lo largo de días o semanas, el primero se puede experimentar en cualquier momento del día mientras que el segundo se produce sólo durante unos minutos o unas horas al día.

Se ha demostrado que la exposición a estrés crónico inducido por un mismo estímulo estresante (homotípico) produce una reducción en ciertas respuestas fisiológicas respecto a la respuesta inicial. Esta disminución del impacto causada por el estresor, a pesar de su persistencia, ha sido denominada adaptación o habituación.

Los parámetros fisiológicos más comúnmente utilizados como marcadores de adaptación son la concentración plasmática de ACTH y de corticosterona (Marti and Armario 1998). Sin embargo, el nivel de corticosterona no es un buen marcador de adaptación en situaciones estresantes de intensidad elevada, ya que por un lado, la secreción adrenocortical se satura rápidamente a concentraciones intermedias de ACTH (Keller-Wood and Dallman 1984) y por el otro, la respuesta adrenocortical máxima a ACTH tras la exposición a estrés crónico severo se incrementa (Armario et al. 1985; Ulrich-Lai et al. 2006). Para considerar los niveles plasmáticos de corticosterona como un marcador de adaptación apropiado habría que evaluar su dinámica una vez terminada la exposición a estrés.

Generalmente, la adaptación de las hormonas periféricas del eje HPA se produce tras la exposición repetida a estímulos estresantes con un componente predominantemente emocional como la inmovilización, en los cuales la confrontación no es realmente dañina para

el organismo. Ante este tipo de estímulos, el organismo adopta una respuesta adaptativa del eje HPA para evitar el agotamiento de sus reservas y evitar desórdenes comportamentales (Campeau et al. 2011).

## **6. SP y regulación del estrés**

La SP y su receptor preferencial están altamente expresados en áreas del cerebro implicadas en la regulación de la respuesta al estrés y la ansiedad como el caudado putamen, la amígdala, el núcleo accumbens, el hipocampo y varios núcleos hipotalámicos, así como la sustancia gris periacueductal y el locus coeruleus.

Por otra parte, existen considerables evidencias que muestran la implicación de la Sustancia P (SP) y su receptor NK1 en numerosos fenómenos relacionados con el estrés y la ansiedad (Ebner and Singewald 2006). Algunas de estas evidencias demuestran que la administración de SP o de agonistas del receptor NK1 aumenta la ansiedad (Bassi et al. 2007a; Bassi et al. 2007b), mientras que el bloqueo del receptor NK1 tiene propiedades ansiolíticas y antidepressivas (Dableh et al. 2005; File 1997; Kramer et al. 1998). A pesar que las pruebas sobre implicación de la SP en los mecanismos de ansiedad son bastante consistentes, Carvalho et al. (Carvalho et al. 2008) publicaron un trabajo en el que se sugieren posibles diferencias regionales; en este trabajo la infusión de SP en el hipocampo dorsal, pero no en el hipocampo ventral, produce un aumento en la actividad tanto en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado como en la zona central del campo abierto, ambos parámetros indicadores del efecto ansiolítico de SP.

Sin embargo, el papel de la SP y de su receptor NK1 en la regulación del eje HPA es claramente inconsistente ya que existen trabajos que sostienen que la administración intracerebroventricular (icv) de SP produce tanto la inhibición (Chowdrey, Jessop, Lightman 1990; Larsen et al. 1993; SapHier et al. 1994) como la activación del eje HPA (Mello et al. 2007). De forma similar, la administración central de antagonistas no peptídicos del receptor NK1 conlleva a resultados contradictorios. Por un lado, Jessop et al. (Jessop et al. 2000) observaron una activación del eje HPA tras la administración icv de un antagonista específico del receptor NK1 en ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización. Esta activación fue reflejada por el mantenimiento, 4 horas después de finalizada la situación estresante, de



niveles elevados tanto de ACTH y CORT como del ARNm del CRF en la región pPVN. Sin embargo, por otro lado trabajos posteriores (Ebner et al. 2008) demostraron que el bloqueo farmacológico a nivel central del receptor NK1 en ratas atenúa la expresión de c-fos en el PVN inducida por la exposición a un estresor medio como el laberinto en cruz elevado (EPM).

Además de estos compuestos se han utilizado modelos de ratones transgénicos carentes del receptor NK1 como herramienta para estudiar la implicación de este receptor en la respuesta al estrés. Entre estos trabajos encontramos un primer estudio en el cual el número de vocalizaciones ultrasónicas inducidas por la separación materna están reducidas en neonatos NK1<sup>-/-</sup> (Rupniak et al. 2000). Los estudios de la respuesta del eje HPA inducida por estrés agudo en ratones transgénicos también son contradictorios (Kandere-Grzybowska et al. 2003; McCutcheon et al. 2008; Santarelli et al. 2001). Santarelli et al. (2001) mostraron que la delección genética del receptor NK1 en ratones con un fondo genético 129/Sv producía una marcada reducción en los niveles de corticosterona en respuesta a 10 min. de exposición al EPM. Sin embargo, la exposición a 30 min. de inmovilización en tubo no produjo alteraciones en el incremento de corticosterona plasmática en ratones NK<sup>-/-</sup> con fondo genético C57BL/6 (Kandere-Grzybowska et al., 2003). McCutcheon et al. (2008) compararon la respuesta a la exposición al estrés entre ratones de fondo genético C57BL/6 puro o C57BL/6-129/Sv, observando que la actividad del eje HPA difiere entre cepas independientemente de la delección del receptor NK1.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## Hipótesis de trabajo

La Sustancia P (SP) y su receptor preferencial (NK1) presentan una amplia distribución cerebral y han sido implicados en numerosos procesos asociados con el estrés y la ansiedad (Culman y et al., 1997; Ebner y Singewald, 2006).

La activación del eje HPA es la respuesta prototípica al estrés en todos los vertebrados, de forma que situaciones de estrés, sistémicas o emocionales, elevan los niveles plasmáticos de hormonas periféricas del eje HPA (ACTH y glucocorticoides) (Armario, 2006). Además, en roedores se ha demostrado que los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona son marcadores de la intensidad del estímulo estresante (Martí y Armario, 1998).

El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) es un área clave en la regulación del eje HPA donde tanto SP como su receptor NK1 están expresados. En el PVN se produce la síntesis y, en respuesta a situaciones estresantes, la liberación a la circulación del factor liberador de corticotropina (CRF) y otros neuropéptidos precursores de ACTH. Por lo tanto, si la SP está implicada en el control de la respuesta al estrés, cabría esperar que este neuromodulador tenga un papel crítico en la regulación del eje HPA. Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 6 de la introducción, el papel de la SP y de su receptor NK1 en la regulación del eje HPA es controvertido y por lo tanto, son necesarios estudios complementarios.

Este trabajo se plantea debido a la escasez y controversia de los datos acerca de la respuesta aguda al estrés en ratones NK1<sup>-/-</sup> y a la inexistencia de estudios sobre como la deleción genética del receptor NK1 puede afectar a la respuesta endocrina y conductual inducida por estrés crónico. De manera que en este trabajo nos planteamos el estudio de la posible implicación del receptor NK1, en los efectos hormonales y conductuales causados por la exposición crónica a estrés por inmovilización en ratón. Dado que la SP y su receptor NK1 están implicados en un número importante de respuestas conductuales y fisiológicas frente a estímulos emocionales hemos utilizado como estresor un estímulo estresante con un componente fundamentalmente emocional, la inmovilización en tubo o "restraint", cuyos efectos estresantes se deben principalmente a la activación emocional que los acompaña.

Nuestra hipótesis es que la delección genética del receptor NK1 puede reducir los efectos negativos inducidos por el estrés crónico y favorecer la adaptación del eje HPA, atenuando las posibles alteraciones comportamentales sobre los niveles de ansiedad, el aprendizaje espacial y la memoria.

### **Objetivos**

El presente trabajo pretende examinar la implicación de la SP en la respuesta adrenocortical y comportamental inducida por la exposición a estrés crónico por inmovilización, utilizando para ello animales knockout para el receptor NK1. Para el desarrollo de este estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Demostrar posibles diferencias en la respuesta del eje HPA, mediante la evaluación de los niveles de corticosterona plasmática, inducida por la exposición aguda y crónica a estrés por inmovilización en animales NK1+/+ y NK1-/-.
2. Evaluar las posibles alteraciones comportamentales sobre los niveles de ansiedad y la memoria espacial, debidas a la exposición a estrés crónico por inmovilización en animales NK1+/+ y NK1-/-:
  - 2.1. Estudio de la expresión de los niveles de ansiedad mediante el ensayo luz-oscuridad.
  - 2.2. Análisis del aprendizaje espacial y la memoria utilizando el laberinto de agua de Morris (MWM).
  - 2.3. Medida de la expresión de los niveles de ansiedad evaluada mediante la tigmotaxis en del MWM.



**MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. Animales de experimentación

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos adultos NK1<sup>-/-</sup> y silvestres (NK1<sup>+/+</sup>). Los ratones originales fueron obtenidos por recombinación homóloga de blastocistos C57BL/6J inyectados con células madre 129/Sv que presentaban una disrupción dirigida del gen que codifica el receptor NK1 (De Felipe et al. 1998). Los ratones utilizados en este trabajo fueron obtenidos mediante 10 generaciones de cruces sucesivos de la línea original C57BL/6J x 129/Sv con ratones C57BL/6J, con objeto de eliminar el fondo genético 129/Sv. Estos animales fueron denominados NK1<sup>-/-</sup> backcross y NK1<sup>+/+</sup> backcross.

Los procedimientos experimentales fueron realizados siempre por la mañana, entre las 08:30 y la 13:00, cuando los niveles hormonales basales y de estrés del eje HPA son estables. Los animales fueron aclimatados a nuestras instalaciones durante una semana en la cual no se les realizó ninguna manipulación. Pasado este periodo, se les habituó a la manipulación por el experimentador y a la toma de muestras de sangre, con el objetivo de minimizar el posible impacto del estrés asociado a dichas manipulaciones. La estabulación se realizó en grupos de 4-5 en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 1$  °C), humedad (55%), iluminación (ciclo luz-oscuridad de 12 h) y agua/comida *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Miguel Hernández de Elche y fueron realizados de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC).

## 2. Inmovilización

La intensidad de la respuesta fisiológica causada por la inmovilización manifiesta su potencia como estímulo estresante, incluso comparado con el choque eléctrico (Marquez, Belda, Armario 2002).

El protocolo de inmovilización consistió en la completa restricción del movimiento del animal en unos inmovilizadores cilíndricos de plexiglás de 2,8 cm de diámetro y 10 cm de longitud. Con el fin de mantener el mismo nivel de inmovilización en todos los animales, independientemente de su tamaño, la parte trasera de los cilindros era capaz de adaptarse según el peso del animal. Siete agujeros, de 1 cm de diámetro, distribuidos por las paredes del cilindro

proporcionaban al animal una ventilación adecuada.

La duración de la exposición a la inmovilización fue de 2h/día durante 9 días para el estudio de posibles diferencias en la respuesta del eje HPA al estrés crónico en ratones NK1-/-, tiempo suficiente para que se produzca la adaptación del eje (Marquez, Nadal, Armario 2004). Mientras que para los estudios comportamentales se prolongó este periodo a 14 días.

### **3. Obtención de muestras de sangre**

La recogida de muestras de sangre se realizó los días 1, 4 y 9. Las muestras de sangre de los animales asignados a los grupos control NK1+/+ y NK1-/- fueron tomadas 2 veces/día con un intervalo de tiempo entre tomas de 2 h, mientras que las muestras de sangre de los animales NK1+/+ y NK1-/- asignados a los grupos de estrés crónico fueron recogidas inmediatamente antes de la inmovilización e inmediatamente después. El procedimiento utilizado fue el de incisión en la cola, técnica que permite obtener niveles hormonales cercanos a los basales si el animal está previamente habituado al procedimiento (Belda, Marquez, Armario 2004). Consiste en una pequeña incisión de unos 2 mm de profundidad en la parte distal de una de las venas de la cola del animal. La sangre se extrajo mediante un leve masaje en la cola con el fin de conducir la sangre hacia el corte y evitar el retroceso venoso. Este método apenas causa dolor a los animales y permite extraer varias muestras de sangre con una sola incisión. A cada animal se le extrajo un volumen máximo de sangre de 300 µl en capilares con EDTA (Sarstedt Microvette CB300), durante un máximo de 2 min. La sangre permaneció siempre a 4 °C hasta la obtención del plasma mediante centrifugación (7100 rpm durante 25 min) a 4 °C. Posteriormente las alícuotas de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

### **4. Radioinmunoanálisis de corticosterona**

La concentración de corticosterona en plasma de las muestras fue determinada mediante una técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo en equilibrio (Marquez, Nadal, Armario 2006). Se usó un tampón fosfato sódico 0.2 M disuelto en agua MilliQ. Las muestras fueron incubadas durante 2 h en ácido cítrico 0.1 M para eliminar la unión de la corticosterona a la globulina de unión a corticosteroides (CBG). Se usó corticosterona sintética (Merck) como

estándar,  $^{125}\text{I}$ -Corticosterona (actividad específica 1500-2000  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , ICN-Biolink 2000) como marcador y un anticuerpo contra corticosterona donado por el Dr. G.B. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungría). La fracción libre se separó con un segundo anticuerpo (donkey  $\alpha$ -rabbit IgG, Serotec) en tampón al 7,5% de Polietilenglicol. La radioactividad de los pellets se midió mediante un contador gamma (Wallac 1272, Clinigamma) y los cálculos para determinar la concentración de corticosterona se llevaron a cabo mediante la transformación  $\log\text{-B}/\text{B}_0$ .

Todas las muestras fueron analizadas en el mismo RIA para evitar variabilidad inter-ensayo. La variabilidad intra-ensayo para la corticosterona fue del 6% y la sensibilidad de la técnica fue de 0.1  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

## 5. Ensayo luz-oscuridad

Este ensayo está basado en la aversión innata de los roedores por áreas intensamente iluminadas y en la conducta exploratoria espontánea de los roedores en respuesta a estresores medios: un ambiente nuevo y un área intensamente iluminada. De este modo los animales están enfrentados al conflicto entre el deseo de explorar una nueva área y la aversión hacia la elevada iluminación. El ensayo de luz-oscuridad ha sido ampliamente utilizado para predecir comportamientos ansiolíticos en ratones, lo cual se refleja en un aumento del tiempo de permanencia o número de entradas en el compartimento iluminado (Hascoet, Bourin, Nic Dhonnchadha 2001).

El ensayo de luz-oscuridad se realizó 48 h después de la última sesión de estrés. El aparato consiste en un compartimento pequeño de color oscuro (27 x 18 x 27 cm alto) conectado por una abertura de 7 x 7 cm con un compartimento grande de color claro (27 x 27 x 27 cm). El compartimento claro está intensamente iluminado (500 lux) comparado con el compartimento oscuro (10 lux). Cada sesión tuvo una duración de 10 minutos, comenzando con la colocación del animal en el compartimento oscuro mirando hacia al compartimento claro. Se cuantificaron tanto el número de entradas como el tiempo de permanencia en el compartimento claro, considerando como entrada cuando el animal posiciona sus cuatro patas en dicho compartimento. Además, se registraron las tentativas de entrada al compartimento claro como

posible índice de ansiedad, donde se incluyen la postura de “stretch-attend” (cuando el ratón se extiende hacia delante y se retrae a la posición original manteniendo las patas inmóviles) y la conducta de “flatback” (locomoción exploratoria donde el animal se extiende en toda su longitud y se mueve hacia adelante con cautela).

## **6. Laberinto de agua de Morris**

El laberinto de agua de Morris (MWM) es un paradigma frecuentemente utilizado para evaluar las capacidades de aprendizaje y memoria en ratones. Es una tarea de navegación espacial en la cual el animal nada para encontrar una plataforma escondida utilizando claves visuales para localizarla. Este ensayo está basado en la alta motivación de los roedores por salir del agua de la forma más rápida posible.

El aparato consiste en una piscina de 120 cm de diámetro llena con agua tibia ( $26\pm 1$  °C) que se opaca mediante la adición de pintura blanca no tóxica. Una plataforma de 10 cm de diámetro se sitúa a 5 mm por debajo de la superficie del agua (condición sumergida) o 8 mm por encima del nivel del agua (con el borde coloreado de oscuro; condición visible). La piscina se divide en cuatro cuadrantes colocando la plataforma en medio de uno de ellos (cuadrante diana).

Este paradigma se realizó de acuerdo con la descripción previa de Grootendorst et al., 2001 aunque con ligeras modificaciones. En cada ensayo, el ratón se colocó en el agua de uno de los cuatro cuadrantes permitiéndole encontrar la plataforma y subirse a ella durante un máximo de 60 s, permaneciendo allí durante 20 s (día 1) o 10 s (ensayos y días restantes). Si el animal no era capaz de encontrar la plataforma, se le guiaba hasta allí con la ayuda de una rejilla y se le permitía permanecer en ella durante 20 s. El mismo ensayo era realizado secuencialmente por cuatro animales durante una sesión. Después de cada ensayo, los animales eran colocados debajo de una lámpara de calor infrarroja roja con el fin de secarlos. Como prueba de adaptación al agua, un día antes de comenzar el entrenamiento espacial en el laberinto de agua, la piscina se llenó 2 cm con agua tibia permitiéndosele a cada ratón moverse durante 120 s. El día 1 el entrenamiento comenzó con 120 s de nado libre en ausencia de la plataforma, lo que sirve para evaluar la capacidad de los ratones para nadar y para que el animal considere la plataforma como un lugar seguro. Sesenta minutos después se

realizó una prueba de entrenamiento con la plataforma visible. Sesenta minutos más tarde se realizó otra prueba de entrenamiento con la plataforma sumergida (ensayo 2). Los días 2 y 3 la plataforma permaneció sumergida y el intervalo entre ensayos fue de aproximadamente 5 min, salvo cuando se especifique lo contrario. En el día 2 se realizaron siete ensayos de entrenamiento (ensayos 3 a 9) con un intervalo de 120 min entre los ensayos 6 y 7. En el día 3 se realizaron cuatro ensayos (ensayos 10 a 13). En todos los ensayos de entrenamiento se registró la latencia (s) y la distancia recorrida (cm) hasta encontrar y subir a la plataforma, la velocidad de nado (cm/s) y el tiempo empleado en la zona periférica (tigmotaxis) como posible medida de ansiedad. Se considera como tigmotaxis cuando el animal nada por la periferia de la piscina (hasta 13 cm de la pared).

Cinco minutos después del último ensayo, se llevó a cabo un ensayo de prueba sin plataforma para evaluar la memoria espacial a corto plazo. Si el animal recuerda la localización habitual de la plataforma nadará más tiempo en el cuadrante diana, es decir, donde previamente estaba situada (Spooner y et al., 1994). Los parámetros registrados para evaluar la memoria fueron la distancia recorrida y el porcentaje de tiempo empleado en cada cuadrante: diana (CD), opuesto (CO), adyacente izquierdo (CAI) y adyacente derecho (CAD).

## 7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Program for Social Science) en su versión 16 para Mac.

En el caso de analizar una única variable dependiente, se utilizó el modelo lineal generalizado (GzLM) sin medidas repetidas. Este método estadístico se caracteriza por ser una herramienta más flexible que los GLM debido a que se pueden elegir distintos tipos de distribución y diferentes estructuras de la covariancia de los datos de las medidas repetidas. Además no se elimina un sujeto con valores perdidos y no requiere las condiciones de aplicación de normalidad y homogeneidad de variancias.

En el caso del análisis mediante medidas repetidas y debido a que en algunos casos no se cumplieron los criterios esenciales para realizar el estudio mediante GLM, se utilizó en todos los experimentos un análisis GzLM con medidas repetidas (ecuaciones estructurales

generalizadas; GEE; (Hardin JM 2003)), bajo una distribución normal. La significación de los efectos estadísticos encontrados mediante este procedimiento se determinó mediante la prueba de chi-cuadrado de Wald usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida.

Los factores inter e intra-sujetos serán comentados en los resultados de cada experimento para una mejor comprensión. En el caso de encontrar interacciones estadísticamente significativas, se realizaron las descomposiciones sucesivas apropiadas.

El criterio de significación en todos los casos se estableció en  $p < 0,05$ , y la significación marginal ( $0,1 > p > 0,05$ ) se muestra sólo como información adicional.





**RESULTADOS**



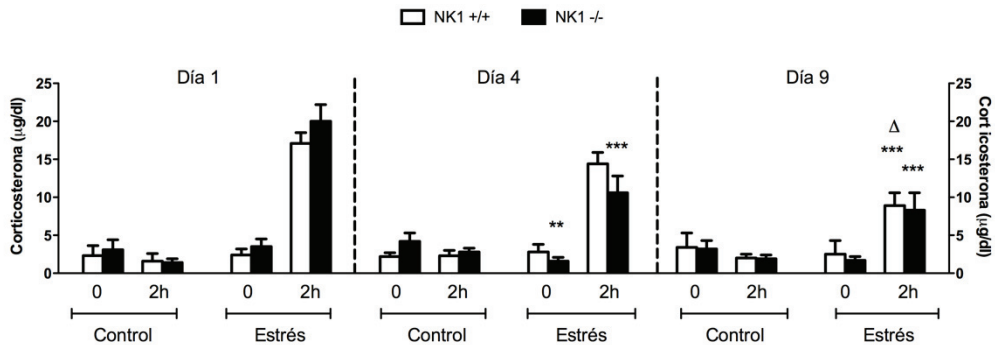


## 1. Efecto del estrés crónico por inmovilización en los niveles de corticosterona plasmática en animales NK1+/+ y NK1-/-

En este experimento analizamos el efecto del estrés crónico por inmovilización sobre los niveles de corticosterona plasmática en animales NK1+/+ y NK1-/- (Fig. 1). Para ello se utilizó el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con estrés y genotipo como factores intersujetos y momento de muestreo y día como factores intrasujetos.

El GEE reveló un efecto de estrés (Wald  $\chi^2(1)=41,21$ ;  $p<0,001$ ), día (Wald  $\chi^2(2)=20,84$ ;  $p<0,001$ ) y momento de muestreo (Wald  $\chi^2(1)=88,10$ ;  $p<0,001$ ), así como una interacción estrés x día (Wald  $\chi^2(2)=17,15$ ;  $p<0,001$ ), estrés x momento de muestreo (Wald  $\chi^2(1)=110,94$ ;  $p<0,001$ ), genotipo x día x momento de muestreo (Wald  $\chi^2(2)=11,44$ ;  $p<0,005$ ) y estrés x día x momento de muestreo (Wald  $\chi^2(2)=23,46$ ;  $p<0,001$ ). La descomposición de las interacciones correspondientes muestra que los niveles basales de corticosterona fueron similares. Sin embargo, la descomposición de la interacción genotipo x día en respuesta a la exposición repetida a estrés por inmovilización mostró que los animales NK1+/+ alcanzaron una reducción estadísticamente significativa en los niveles de CORT plasmática el día 9 comparado tanto con el día 1 (\*\* $p<0,001$ ) como con el día 4 ( $p<0,05$ ), mientras que en los animales NK1-/- esta reducción ya fue estadísticamente significativa el día 4 y se mantuvo el día 9 (\*\* $p<0,001$  en ambos casos).

Estos resultados muestran que la respuesta de corticosterona a estrés agudo por inmovilización en tubo no difiere entre genotipos. Sin embargo, el curso temporal de la adaptación del eje HPA en respuesta a la exposición repetida a este estresor es distinta entre genotipos, mostrando una mayor velocidad de adaptación del eje HPA los animales NK1-/- que los NK1+/+.



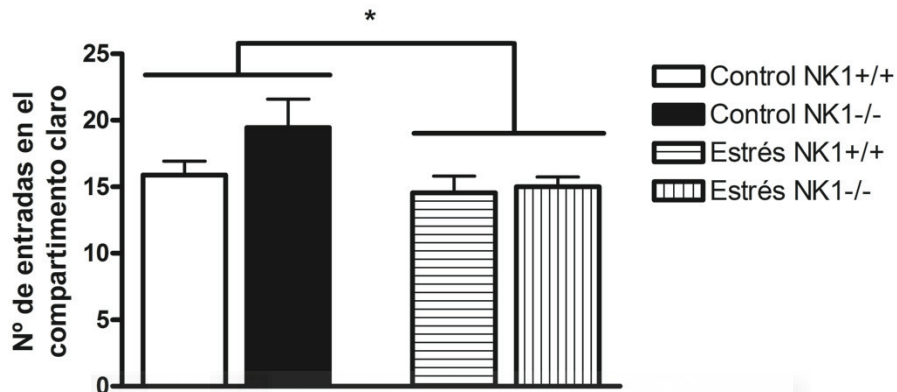
**Figura 1. Niveles de corticosterona plasmática en animales control y expuestos a estrés crónico por inmovilización NK1+/+ y NK1-/-.** Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M (n=7-8/grupo) de la concentración de corticosterona plasmática. Las muestras fueron tomadas antes (0) e inmediatamente después del estrés (2 h) los días 1, 4 y 9. El análisis GEE mostró que la exposición repetida a estrés por inmovilización produjo una disminución en los niveles de CORT plasmática que fue estadísticamente significativa el día 9 en los animales NK1+/+, comparado con el mismo genotipo y momento de muestreo, (\*\* $p < 0.001$  vs. día 1;  $\Delta p < 0.05$  vs. día 4) y el día 4 en los animales NK1-/-, comparado con el mismo genotipo y momento de muestreo, (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ambos vs. día 1).

## 2. Efecto del estrés crónico por inmovilización sobre la ansiedad medida en el ensayo luz-oscuridad en animales NK1+/+ y NK1-/-

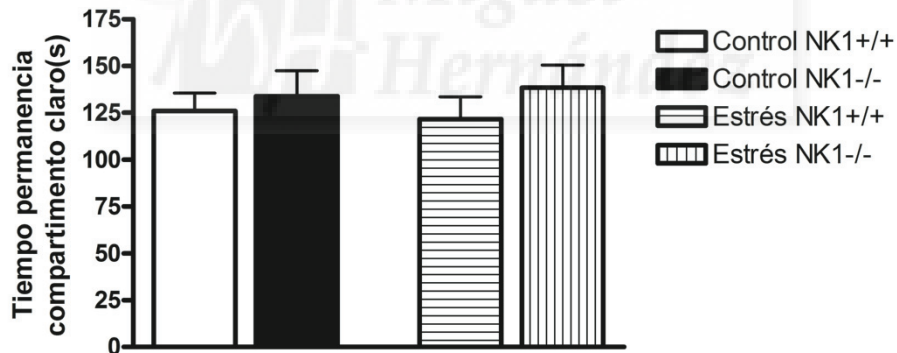
Los resultados del ensayo luz-oscuridad se analizaron utilizando el modelo lineal generalizado (GzLM) con el estrés y el genotipo como factores intersujetos. El análisis estadístico del número de entradas en el compartimento claro (Fig. 2A) reveló un efecto significativo de estrés (Wald  $\chi^2(1) = 4,46$ ;  $p < 0,05$ ) pero no efecto de genotipo o interacción estrés x genotipo. Los animales expuestos a inmovilización, independientemente del genotipo, mostraron un menor número de entradas en el compartimento claro. Sin embargo, el análisis GzLM del tiempo empleado en el compartimento claro (Fig. 2B) no reveló efectos estadísticamente significativos. Además, se midió tanto la actividad espontánea como el comportamiento de “stretch-attend” en el compartimento claro, no encontrándose diferencias entre grupos en lo que se refiere a la actividad.

Estos datos indican que la exposición a estrés crónico por inmovilización induce un incremento en los niveles de ansiedad de ambos genotipos, reflejado por la reducción significativa del número de entradas en el compartimento claro.

A.



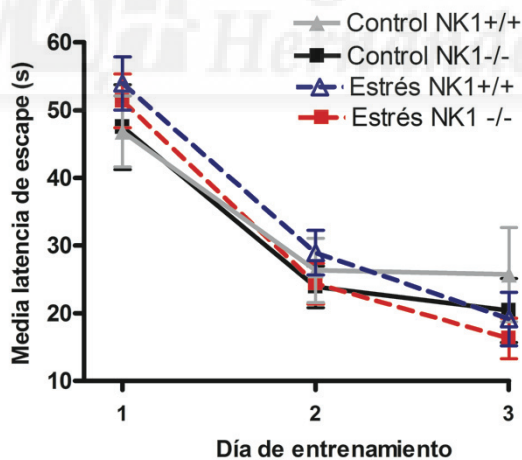
B.



**Figura 2. Ensayo luz-oscuridad 48h después de la exposición a estrés crónico por inmovilización en animales NK1+/+ y NK1-/-. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. (n=8-9/grupo) del número de entradas (2A) y del tiempo empleado (2B) en el compartimento claro. El análisis GzLM no reveló efecto de genotipo ni interacción estrés x genotipo, pero mostró un efecto significativo de estrés (\*  $p < 0,05$  vs. grupo control) en el número de entradas. El análisis GzLM no reveló ningún efecto significativo en el tiempo empleado en el compartimento claro.**

### 3. Efecto del estrés crónico por inmovilización sobre el aprendizaje espacial medido en el laberinto de agua de Morris en animales NK1+/+ y NK1-/-

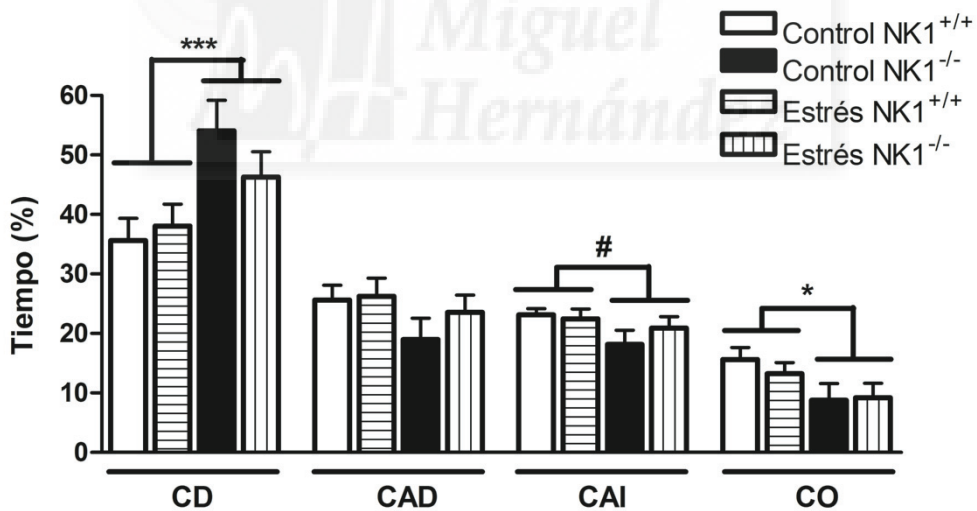
En el análisis del efecto del estrés crónico por inmovilización sobre el aprendizaje espacial medido en el laberinto de agua de Morris de animales NK1+/+ y NK1-/- (Fig. 3) utilizamos el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con el estrés y el genotipo como factores intersujetos y el día de entrenamiento como factor intrasujetos (con 3 niveles). El GEE reveló un efecto de día de entrenamiento (Wald  $\chi^2(2)= 105,01$ ;  $p<0,005$ ) pero no se encontraron efectos significativos de genotipo o estrés, ni interacción estrés x genotipo o día de entrenamiento x genotipo. Estos resultados mostraron que los animales de todos los grupos aprendieron a encontrar la plataforma a lo largo de los días de entrenamiento siguiendo un patrón similar de aprendizaje. La interacción estrés x día de entrenamiento reveló un efecto marginal (Wald  $\chi^2(2)=5,74$ ;  $p=0,056$ ), lo que sugiere que los animales expuestos a inmovilización, independientemente del genotipo, aprendieron a encontrar la plataforma de forma más rápida a lo largo de los entrenamientos que los animales control.



**Figura 3. Aprendizaje espacial en el MWM tras estrés crónico por inmovilización en animales NK1+/+ y NK1-/-.** Cada punto representa la media  $\pm$  SEM ( $n=8-10$ /grupo) de la media de las latencias de escape en cada día de entrenamiento. El análisis GEE reveló únicamente efecto significativo de día de entrenamiento ( $p<0,005$ ).

Los resultados del tiempo empleado buscando en cada cuadrante obtenidos en el ensayo de prueba del MWM (Fig. 4) se analizaron utilizando el modelo lineal generalizado de medidas repetidas (GEE) con el estrés y el genotipo como factores intersujetos y el cuadrante como factor intrasujetos (con 4 niveles). El análisis mostró un efecto significativo de cuadrante

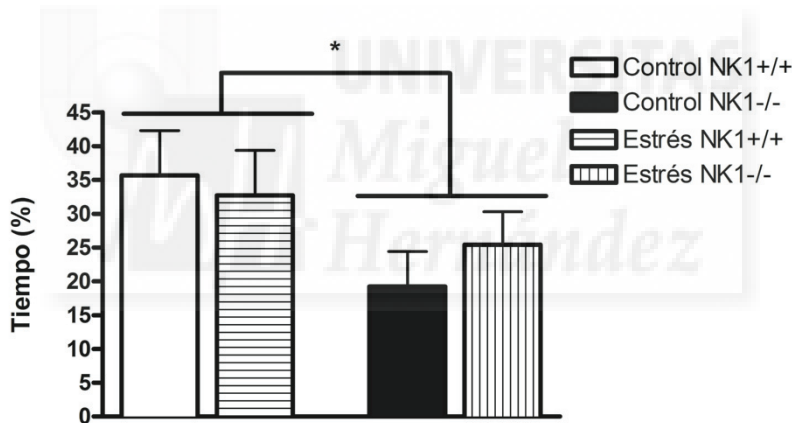
(Wald  $\chi^2(3)= 180,13$ ;  $p<0,001$ ) pero no se encontraron efectos significativos de genotipo o estrés, ni interacción estrés x genotipo o estrés x cuadrante. Sin embargo, la interacción cuadrante x genotipo fue significativa (Wald  $\chi^2(3)= 13,92$ ;  $p<0,005$ ). La descomposición de la interacción mostró que, independientemente del estrés, los ratones NK1<sup>-/-</sup> emplearon más tiempo en el CD y menos en el CO que los ratones silvestres. Esta preferencia por el cuadrante donde estaba localizada la plataforma mostrada por los ratones NK1<sup>-/-</sup> refleja una mayor capacidad para retener la tarea que los animales silvestres. Además se encontró una diferencia marginalmente significativa entre genotipos en el tiempo empleado en el CAI donde los animales NK1<sup>-/-</sup> emplearon menos tiempo que los NK1<sup>+/+</sup>.



**Figura 4.** Tiempo empleado buscando en cada cuadrante en el ensayo de prueba del MWM tras estrés crónico por inmovilización en animales NK1<sup>+/+</sup> y NK1<sup>-/-</sup>. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM ( $n=8-10$ /grupo). Leyenda cuadrantes: CD, cuadrante diana; CAD, adyacente derecho; CAI, adyacente izquierdo; CO, opuesto. El análisis GEE reveló un efecto significativo en la interacción cuadrante x genotipo ( $p<0,005$ ). La descomposición de la interacción reveló que los animales NK1<sup>-/-</sup>

emplearon más tiempo en el CD que los NK1+/+ (\*\*p=0,001) y menos en el CO (\*p=0,012); y se encontró un efecto marginalmente significativo de genotipo en el CAI (#p=0,055).

Los datos de la tigmotaxis obtenidos en el MWM (Fig. 5) se analizaron utilizando el modelo lineal generalizado (GzLM) con el estrés y el genotipo como factores intersujetos. El análisis mostró un efecto significativo de genotipo, (Wald  $\chi^2(1)=4,41$ ;  $p<0,05$ ), pero no se encontraron efectos significativos de estrés o interacción estrés x genotipo. Estos resultados muestran que los animales NK1-/- presentan una menor preferencia por la zona periférica de la piscina, lo que sugiere que utilizan una estrategia de aprendizaje más eficiente que los animales silvestres.



**Figura 5. Tigmotaxis en el ensayo de prueba del MWM tras estrés crónico por inmovilización en animales NK1+/+ y NK1-/-. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM (n=8–10/grupo) del tiempo empleado en la periferia del MWM. El análisis GzLM reveló un efecto significativo de genotipo (\*p<0,05) donde los animales NK1-/-, independientemente del estrés, emplearon menos tiempo en la zona periférica que los animales NK1+/+.**

## DISCUSIÓN







## 1. Implicación de la SP en la respuesta del eje HPA a la exposición aguda y crónica a estrés por inmovilización

En un primer experimento quisimos estudiar los niveles basales del eje HPA en ratones silvestres y mutantes para el receptor NK1 y la respuesta del mismo a la exposición aguda y crónica a estrés por inmovilización. En referencia a la actividad basal del eje HPA los resultados muestran que es similar en ambos genotipos, ya que los niveles basales de CORT plasmática de los animales NK1+/+ no son estadísticamente distintos a los de los animales NK1-/. De la misma forma, la respuesta a inmovilización aguda observada el día 1 es similar entre ambos genotipos. Sin embargo, aunque la exposición repetida a estrés por inmovilización produce una reducción en los niveles de CORT tanto en animales silvestres como mutantes los resultados muestran algunas diferencias entre genotipos en la adaptación del eje HPA en respuesta a este estresor. Mientras que en los animales NK1+/+ la reducción en los niveles de CORT se observó únicamente el día 9 comparado con el día 1, en los animales NK1-/- esta reducción ya fue observada el día 4 y mantenida a ese nivel hasta el día 9. En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio muestran que en los animales carentes del receptor NK1 la respuesta de corticosterona a estrés agudo por inmovilización es normal pero la velocidad de adaptación del eje HPA a la exposición repetida a este estresor es mayor comparado con los animales silvestres.

El papel del receptor NK1 en la respuesta del eje HPA al estrés es claramente controvertido. Mientras que Santarelli (Santarelli et al. 2001) observaron que la exposición a un estresor medio como el EPM producía una disminución de la respuesta de la corticosterona en ratones carentes del receptor NK1, trabajos posteriores (Kandere-Grzybowska et al. 2003) no mostraron alteraciones en la respuesta de la corticosterona plasmática a la exposición a estrés por inmovilización en ratones NK1-/. Estas diferencias en la actividad del eje HPA podrían ser debidas a que el fondo genético de los animales empleados difiere entre los dos trabajos (129/Sv vs. C57BL/6).

Nuestros datos están en concordancia con los publicados por McCutcheon (McCutcheon et al. 2008) en los cuales mostraron que los niveles de CORT plasmática en respuesta a estrés agudo por inmovilización en los animales carentes del receptor NK1 eran similares a los de los animales silvestres, independientemente del fondo genético de los animales utilizados

(C57BL/6 puro o C57BL/6- 129/Sv). Sin embargo, en este mismo estudio ellos observaron diferencias en la respuesta a la exposición a inmovilización (en tubo 30 min.) entre cepas, siendo la respuesta en los niveles de corticosterona mayor en los animales con fondo genético C57BL/6- 129/Sv que con fondo genético C57BL/6 puro. Por tanto, puede que los efectos de la mutación sobre el gen NK1 estén modulados por estas diferencias en la actividad del eje HPA y que los efectos de la delección del receptor NK1 esté restringida a ratones con un fondo genético 129/Sv puro (Peinado et al. 2005).

La habituación parcial de la respuesta de la corticosterona a la exposición repetida a estrés por inmovilización se considera un marcador de la adaptación del eje HPA a este estresor. Esta adaptación del eje HPA observada en nuestro trabajo concuerda con estudios previos realizados en rata (Chen and Herbert 1995; Hauger et al. 1990; Ma and Lightman 1998); por ejemplo, Natelson et al. (Natelson et al. 1988) observaron que los animales expuestos repetidamente a un mismo estímulo estresante mostraban una habituación parcial en su respuesta de corticosterona a lo largo del tiempo. Nuestros resultados muestran que el curso temporal de la adaptación del eje HPA en respuesta a la exposición repetida a una misma situación estresante, en este caso inmovilización en tubo, difiere entre genotipos. Los animales NK1<sup>-/-</sup> muestran una rápida adaptación del eje HPA comparado con los animales silvestres por lo que la activación del receptor NK1 podría tener alguna implicación en el mantenimiento de esta respuesta, retrasando la adaptación al estrés.

## **2. Implicación de la SP en las alteraciones sobre la ansiedad inducidas por la exposición crónica a estrés por inmovilización**

En este experimento quisimos estudiar la implicación del receptor NK1 en los efectos sobre la ansiedad tras 14 días de exposición a estrés por inmovilización. Para ello se analizaron los niveles de ansiedad en el ensayo luz-oscuridad dos días después (esto se considera corto plazo, largo es una semana; (Dal-Zotto et al. 2004)) de la finalización del protocolo de exposición a estrés crónico en ratones NK1<sup>-/-</sup> y NK1<sup>+/+</sup>. Los resultados obtenidos en este ensayo muestran, tanto en animales mutantes como silvestres, un leve efecto ansiogénico debido al estrés. En este sentido Mitra et al. (Mitra et al. 2005) también observaron en roedores efectos ansiogénicos producidos por inmovilización en tubo y evaluados en el EPM entre los

días 1 y 10 postestrés. Este incremento de la ansiedad se refleja en el ensayo luz-oscuridad por la observación de una reducción significativa en el número de entradas en el compartimento claro.

La evaluación de los niveles de ansiedad en ratones NK1<sup>-/-</sup> mediante el ensayo del laberinto en cruz elevado ha sido realizada por diversos grupos de investigación, encontrando resultados contrapuestos en función del fondo genético de los animales empleados. En ratones NK1<sup>-/-</sup> con un fondo genético 129/Sv puro se observó una disminución en los niveles de ansiedad (Santarelli et al. 2001), mientras que en ratones NK1<sup>-/-</sup> con un fondo genético C57BL/6-129/Sv no se advirtieron alteraciones en estos niveles (Murtra et al. 2000; Rupniak et al. 2001). Además, posteriormente se generó una nueva línea de ratones carentes del receptor NK1 cruzando animales de fondo genético C57BL/6-129/Sv con animales pertenecientes a la cepa no congénita, MF1. Trabajos realizados con esta línea de ratones mostraron en los animales NK1<sup>-/-</sup> una mayor actividad locomotora inducida por la exposición a ambientes nuevos y una reducción en ciertos parámetros indicadores de la ansiedad evaluados en el ensayo luz-oscuridad (Fisher et al. 2007; Herpfer and Lieb 2005). Todo esto sugiere que las diferencias en los niveles de ansiedad están claramente influenciadas por el fondo genético de los ratones utilizados, siendo los efectos de la delección del receptor NK1 dependientes del fondo genético. En la bibliografía existen trabajos que demuestran esta divergencia en el fenotipo entre cepas congénitas portadoras de la misma mutación (Van Bogaert et al. 2006). Está demostrada la influencia del fondo genético sobre el fenotipo de animales mutantes. La mayoría de ratones mutantes (como los NK1<sup>-/-</sup>) han sido generados por recombinación homóloga a partir de células madre embrionarias (ES) pertenecientes a la cepa de ratón 129/Sv y a las que se les ha inducido una mutación en un determinado gen. Estas ES son inyectadas en blastocistos de ratones C57BL/6 y finalmente, las quimeras resultantes se cruzan con ratones C57BL/6. Los ratones obtenidos mediante este tipo de cruces son portadores de alelos de ambas cepas. Además, se ha demostrado que los ratones de ambas cepas (C57BL/6 y 129/Sv) son muy diferentes fenotípicamente, encontrándose diferencias marcadas en numerosas pruebas conductuales (Homanics, Quinlan, Firestone 1999; Paulus et al. 1999).

Cabe resaltar la existencia de trabajos que sugieren que los efectos sobre la ansiedad ejercidos por la ausencia de los neuropéptidos sustancia P (SP) y neuroquinina A (NKA) son más potentes que los debidos al bloqueo del receptor NK1. De hecho, estudios realizados en ratones (C57BL/6) carentes del receptor que codifica para los neuropéptidos sustancia P y neuroquinina A (NKA),  $Taq1^{-/-}$ , mostraron unos menores niveles de ansiedad en diversos ensayos comportamentales (Bilkei-Gorzo et al. 2002). Sin embargo, cabría esperar que los efectos de estos neuropéptidos estuvieran mediados principalmente por el receptor NK1 ya que la SP se une preferencialmente al receptor NK1, altamente expresado en diversas áreas del SNC mientras que la NKA presenta mayor afinidad por el receptor NK2, el cual sólo se encuentra expresado a bajos niveles en ciertas áreas cerebrales.

Existen evidencias tanto en rata como en ratón que indican que los factores de susceptibilidad de cada cepa pueden determinar la respuesta al estrés (Mineur, Belzung, Crusio 2006). Un ejemplo de las diferencias en la susceptibilidad al estrés en ratones se demuestra en el trabajo de Tannenbaum y Anisman (Tannenbaum and Anisman 2003) donde la exposición a estrés crónico aumenta la ansiedad y la depresión en ratones pertenecientes a la cepa BALB/cByJ pero no en C57BL/6ByJ. Además, en la bibliografía existe controversia acerca de los efectos sobre la ansiedad inducidos por la exposición a estrés crónico por inmovilización. En este sentido, se han descrito resultados contradictorios, por un lado el trabajo de Cancela et al. (Cancela, Bregonzio, Molina 1995) en el cual ratas expuestas a estrés crónico por inmovilización mostraron una disminución en los niveles de ansiedad, evaluado en el ensayo luz-oscuridad. En contraposición, trabajos posteriores demostraron que la exposición a esta misma situación estresante producía una disminución tanto en el número de entradas como en el tiempo empleado en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, indicando un efecto ansiogénico (Vyas et al. 2002). Por tanto, es necesario poner especial atención en los factores que determinan la susceptibilidad frente a la resistencia a los estresores.

### **3. Implicación de la SP en las alteraciones sobre el aprendizaje espacial y la memoria inducidas por la exposición crónica a estrés por inmovilización**

Cuatro días después de la finalización del protocolo de estrés crónico por inmovilización quisimos evaluar sus posibles efectos sobre el aprendizaje espacial y la memoria en ratones

NK1+/+ y NK1-/-, utilizando para ello el laberinto de agua de Morris (MWM).

Los resultados del ensayo del MWM no muestran efectos debidos al estrés crónico por inmovilización aunque sí se observan diferencias entre genotipos en algunos de los parámetros evaluados. A lo largo de los días de entrenamiento los animales de ambos genotipos son capaces de aprender a encontrar la plataforma escondida mostrando latencias de escape semejantes, lo cual sugiere que animales silvestres y mutantes presentan un patrón de aprendizaje similar. Sin embargo, durante el ensayo de prueba del MWM los animales NK1-/- emplearon menos tiempo en la zona periférica que los animales NK1+/+, lo cual sugiere una mejor estrategia de aprendizaje por parte de los animales mutantes. Parece improbable que esta reducción en la tigmotaxis esté asociada con una reducción en los niveles de ansiedad ya que no se observó efecto de genotipo en el ensayo luz-oscuridad, paradigma específico y extensamente utilizado para advertir comportamientos ansiolíticos en ratones. En este sentido, estudios observados en ratones han sugerido que el patrón de búsqueda tigmotáctica y la baja habilidad para encontrar la plataforma no están relacionados con los cambios en los niveles de ansiedad. De hecho, la administración de diazepam, droga clásicamente ansiolítica, en ratones que sobreexpresan los receptores  $\alpha 2C$ -adrenoreceptores y que muestran un inefectivo patrón de búsqueda tigmotáctica durante el entrenamiento en el MWM, no afecta a la estrategia de búsqueda (Bjorklund et al. 1999).

Durante el ensayo de prueba del MWM los ratones NK1-/- mostraron mayor preferencia por el cuadrante donde estaba localizada la plataforma que los animales silvestres, lo cual refleja una mayor memoria a corto plazo (5 min). Este incremento en la capacidad para retener la tarea podría ser consecuencia del aumento tanto de la neurogénesis como de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo de los animales mutantes como describió Morcuende et al. (Morcuende et al. 2003). Lee et al., (Lee, Duan, Mattson 2002) sugirieron que el BDNF juega un papel crítico en la neurogénesis basal, por lo que el incremento de los niveles de BDNF induciría el aumento de la proliferación de nuevas neuronas observado en el hipocampo de los animales NK1-/- . Además, estos dos factores han sido relacionados positivamente con tareas dependientes de hipocampo como el aprendizaje y la memoria espacial (Bekinschtein et al. 2008; Deng, Aimone, Gage 2010). Sin embargo, Morcuende et al. (2003) no pudieron correlacionar el incremento en los niveles de BDNF y la neurogénesis observados en el hipocampo de los ratones NK1-/-, con dos tareas dependientes

de hipocampo como el MWM y el miedo condicionado. De igual modo, en este trabajo no se ha detectado una mayor capacidad de aprendizaje espacial en los animales carentes del receptor NK1, aunque en ambos estudios se ha detectado una mayor memoria a corto plazo en los animales mutantes, reflejada por la preferencia mostrada por el cuadrante en el que se encontraba localizada la plataforma durante el ensayo de prueba del MWM.

Nuestros resultados muestran que la exposición a estrés crónico no produce alteraciones en el aprendizaje espacial en ninguno de los dos genotipos, por tanto el bloqueo del receptor NK1 no aumenta la sensibilidad frente al estrés. Además, esta ausencia de efecto inducido por la exposición a estrés crónico por inmovilización sobre el aprendizaje espacial observado en nuestros experimentos está en concordancia con experimentos realizados en ratas, en los cuales es necesario exponer a los animales a un protocolo de inmovilización superior a dos semanas para observar déficits de aprendizaje espacial. Estos resultados manifiestan la importancia de la duración de la exposición al estrés, sugiriendo que sólo las exposiciones prolongadas causan adaptaciones aberrantes que influyen de forma negativa en el aprendizaje y la memoria.

Existen numerosos factores implicados en la variabilidad de los resultados encontrados en la evaluación de los efectos del estrés crónico sobre el aprendizaje espacial: tipo de ensayo, variables valoradas, tipo y duración del estímulo estresante, condiciones de estabulación de los animales, e intervalo entre la finalización de la exposición al estrés y el inicio del ensayo (Conrad 2010). Otro factor a tener en cuenta en la variabilidad entre resultados, y del que ya hemos hablado extensamente, es la cepa de los animales utilizados. Palumbo et al. (Palumbo et al. 2009) hicieron un estudio comparativo entre dos cepas de ratón, C57BL/6 y BALB/c, en el que observaron que los efectos en el aprendizaje y la memoria en respuesta a estrés crónico de intensidad moderada fueron diferentes entre cepas, siendo nuevamente los ratones C57BL/6 más resistentes a la exposición a estrés. En el mismo sentido, Pothion et al. (Pothion et al. 2004) observaron que la exposición a estrés crónico no predecible de intensidad moderada no produce efectos en el aprendizaje espacial evaluado en el MWM en tres cepas distintas de ratones (CBA/H, DBA/2J y C57BL/6) aunque si se observó una reducción en la memoria a largo plazo en los animales de la cepa CBA/H, por tanto la sensibilidad frente a la exposición a este tipo de estresor varía dependiendo de la cepa de ratón empleada. En otros

estudios en los que se ha utilizado el laberinto radial de ocho brazos, tarea también hipocampo-dependiente, si se han encontrado alteraciones en el aprendizaje tras la exposición a estrés crónico acústico en ratones C57BL/6 (Ambrosini et al. 2005), por tanto puede que el laberinto radial sea más sensible que el MWM.





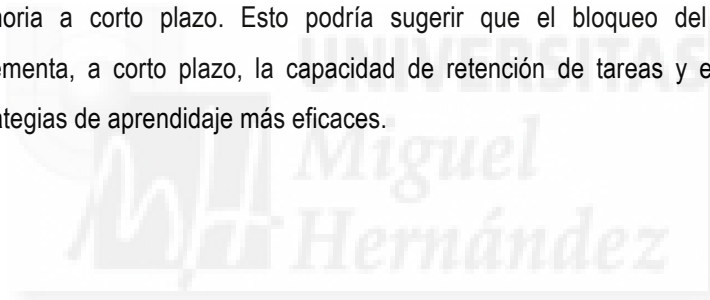


## CONCLUSIONES





1. Los niveles basales de corticosterona plasmática y su respuesta a estrés agudo por inmovilización son similares en animales NK1+/+ y NK1-/. Sin embargo, la habituación de su respuesta como reflejo de la velocidad de adaptación del eje HPA, en respuesta a la exposición repetida a este estresor, es mayor en animales NK1-/-; esto parece indicar que la activación del receptor NK1 está implicada en el mantenimiento de esta respuesta, retrasando la habituación del eje HPA.
2. La exposición a estrés crónico por inmovilización produce un ligero incremento en la ansiedad, evaluado mediante el ensayo luz-oscuridad, tanto en animales NK1-/- como NK1+/+.
3. En ninguno de los dos genotipos el estrés crónico por inmovilización indujo alteraciones en el aprendizaje y la memoria, evaluados mediante el MWM, aunque algunos de los parámetros evaluados los animales NK1-/- muestran una mayor memoria a corto plazo. Esto podría sugerir que el bloqueo del receptor NK1 incrementa, a corto plazo, la capacidad de retención de tareas y el desarrollo de estrategias de aprendizaje más eficaces.





## BIBLIOGRAFÍA

*MH* Miguel  
Hernández



- Abrahao KP, Quadros IM, Souza-Formigoni ML. 2009. Individual differences to repeated ethanol administration may predict locomotor response to other drugs, and vice versa. *Behav Brain Res* 197(2):404-10.
- Aguilera G, PHam Q, Rabadan-Diehl C. 1994. Regulation of pituitary vasopressin receptors during chronic stress: Relationship to corticotropH responsiveness. *J Neuroendocrinol* 6(3):299-304.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85(3):525-35.
- Ali SF, Newport GD, Slikker W, Jr. 1996. Methamphetamine-induced dopaminergic toxicity in mice. role of environmental temperature and pharmacological agents. *Ann N Y Acad Sci* 801:187-98.
- Aliakbari J, Sreedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ. 1987. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 148(3):1440-5.
- Ambrosini MV, Mariucci G, Tantucci M, Van Hooijdonk L, Ammassari-Teule M. 2005. Hippocampal 72-kDa heat shock protein expression varies according to mice learning performance independently from chronic exposure to stress. *Hippocampus* 15(4):413-7.
- Anagnostaras SG and Robinson TE. 1996. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: Modulation by associative learning. *Behav Neurosci* 110(6):1397-414.
- Angulo JA, Angulo N, Yu J. 2004. Antagonists of the neurokinin-1 or dopamine D1 receptors confer protection from methamphetamine on dopamine terminals of the mouse striatum. *Ann N Y Acad Sci* 1025:171-80.
- Arai H and Emson PC. 1986. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Res* 399(2):240-9.
- Armario A. 2006. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: What can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(5):485-501.
- Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Castellanos JM. 1986. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* 39(5):471-5.

Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J. 1985. Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci* 36(22):2085-92.

Arroyo M, Markou A, Robbins TW, Everitt BJ. 1998. Acquisition, maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration under a second-order schedule of reinforcement in rats: Effects of conditioned cues and continuous access to cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 140(3):331-44.

Aubry JM, Lundstrom K, Kawashima E, Ayala G, Schulz P, Bartanusz V, Kiss JZ. 1994. NK1 receptor expression by cholinergic interneurons in human striatum. *Neuroreport* 5(13):1597-600.

Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K, Katayama I. 2002. Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 127(4):316-21.

Ballesteros-Yanez I, Ambrosio E, Perez J, Torres I, Miguens M, Garcia-Lecumberri C, DeFelipe J. 2008. Morphine self-administration effects on the structure of cortical pyramidal cells in addiction-resistant rats. *Brain Res* 1230:61-72.

Ballesteros-Yanez I, Ambrosio E, Benavides-Piccione R, Perez J, Torres I, Miguens M, Garcia-Lecumberri C, DeFelipe J. 2007. The effects of morphine self-administration on cortical pyramidal cell structure in addiction-prone Lewis rats. *Cereb Cortex* 17(1):238-49.

Bannon MJ, Pruetz B, Barfield E, Schmidt CJ. 2004. Transcription factors specifying dopamine phenotype are decreased in cocaine users. *Neuroreport* 15(3):401-4.

Bannon MJ, Pruetz B, Manning-Bog AB, Whitty CJ, Michelhaugh SK, Sacchetti P, Granneman JG, Mash DC, Schmidt CJ. 2002. Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6382-5.

Barnea-Ygael N, Gal R, Zangen A. 2014. Chronic cocaine administration induces long-term impairment in the drive to obtain natural reinforcers in high- but not low-demanding tasks. *Addict Biol* .

Barron S, White A, Swartzwelder HS, Bell RL, Rodd ZA, Slawecki CJ, Ehlers CL, Levin ED, Rezvani AH, Spear LP. 2005. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: Findings from rodent models. *Alcohol Clin Exp Res* 29(9):1720-5.



Bassi GS, Nobre MJ, de Araujo JE, Brandao ML. 2007a. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. *Neuropeptides* 41(6):365-74.

Bassi GS, Nobre MJ, Carvalho MC, Brandao ML. 2007b. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. *Behav Brain Res* 182(2):301-7.

Beaujouan JC, Heuillet E, Petitot F, Saffroy M, Torrens Y, Glowinski J. 1993. Higher potency of RP 67580, in the mouse and the rat compared with other nonpeptide and peptide tachykinin NK1 antagonists. *Br J Pharmacol* 108(3):793-800.

Bechara A. 2001. Neurobiology of decision-making: Risk and reward. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6(3):205-16.

Becker HC and Lopez MF. 2004. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res* 28(12):1829-38.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katzev C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7):2711-6.

Belda X, Marquez C, Armario A. 2004. Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: Comparison of two outbred rat strains. *Behav Brain Res* 154(2):399-408.

Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. 1993. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112(4):503-10.

Bellucci F, Carini F, Catalani C, Cucchi P, Lecci A, Meini S, Patacchini R, Quartara L, Ricci R, Tramontana M, et al. 2002. Pharmacological profile of the novel mammalian tachykinin, hemokinin 1. *Br J Pharmacol* 135(1):266-74.

Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. 1998. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* 53(4):649-55.

Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH. 1996. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. *Nat Genet* 12(1):81-4.

Berger UV, Gu XF, Azmitia EC. 1992. The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur J Pharmacol* 215(2-3):153-60.

Berridge KC and Robinson TE. 1998. What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28(3):309-69.

Beyer CE and Steketee JD. 1999. Dopamine depletion in the medial prefrontal cortex induces sensitized-like behavioral and neurochemical responses to cocaine. *Brain Res* 833(2):133-41.

Bigioni M, Benzo A, Irrissuto C, Maggi CA, Goso C. 2005. Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs* 16(10):1083-9.

Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Zimmer A. 2002. Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. *J Neurosci* 22(22):10046-52.

Bilsky EJ, Montegut MJ, Nichols ML, Reid LD. 1998. CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. *Pharmacol Biochem Behav* 59(1):215-20.

Birnbaumer M. 2000. Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11(10):406-10.

Bijou Y, De Deurwaerdere P, Spampinato U, Stinus L, Cador M. 2002. D-amphetamine-induced behavioral sensitization: Effect of lesioning dopaminergic terminals in the medial prefrontal cortex, the amygdala and the entorhinal cortex. *Neuroscience* 109(3):499-516.

Bjorklund M, Sirvio J, Sallinen J, Scheinin M, Kobilka BK, Riekkinen P, Jr. 1999.  $\alpha$ 2C-adrenoceptor overexpression disrupts execution of spatial and non-spatial search patterns. *Neuroscience* 88(4):1187-98.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Weiss SM, Meyer S. 1990. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. *Pharmacol Biochem Behav* 35(4):775-80.

---

Bobes García J and Sáiz Martínez P. 2003. MONOGRAFÍA DROGAS DE USO RECREATIVO. .

Boix F, Sandor P, Nogueira PJ, Huston JP, Schwarting RK. 1995. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neuroscience* 64(4):1045-55.

Borgland SL, Malenka RC, Bonci A. 2004. Acute and chronic cocaine-induced potentiation of synaptic strength in the ventral tegmental area: Electrophysiological and behavioral correlates in individual rats. *J Neurosci* 24(34):7482-90.

Botia B, Legastelois R, Alaux-Cantin S, Naassila M. 2012. Expression of ethanol-induced behavioral sensitization is associated with alteration of chromatin remodeling in mice. *PLoS One* 7(10):e47527.

Boudreau AC and Wolf ME. 2005. Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 25(40):9144-51.

Breuner CW and Orchinik M. 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175(1):99-112.

Burcher E, Alouan LA, Johnson PR, Black JL. 1991a. Neuropeptide gamma, the most potent contractile tachykinin in human isolated bronchus, acts via a 'non-classical' NK2 receptor. *Neuropeptides* 20(2):79-82.

Burcher E, Mussap CJ, Geraghty DP, McClure-Sharp JM, Watkins DJ. 1991b. Concepts in characterization of tachykinin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 632:123-36.

Butovsky E, Juknat A, Goncharov I, Elbaz J, Eilam R, Zangen A, Vogel Z. 2005. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to delta-tetrahydrocannabinol. *J Neurochem* 93(4):802-11.

Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, Carletti R. 2003. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci* 17(9):1736-46.

Cabib S, Orsini C, Le Moal M, Piazza PV. 2000. Abolition and reversal of strain differences in behavioral responses to drugs of abuse after a brief experience. *Science* 289(5478):463-5.

Cadet JL, Thiriet N, Jayanthi S. 2001. Involvement of free radicals in MDMA-induced neurotoxicity in mice. *Ann Med Interne (Paris)* 152 Suppl 3:IS57-9.

Cadet JL, Ladenheim B, Hirata H, Rothman RB, Ali S, Carlson E, Epstein C, Moran TH. 1995. Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): Evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse* 21(2):169-76.

Cadoni C, Pisanu A, Solinas M, Acquas E, Di Chiara G. 2001. Behavioural sensitization after repeated exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)* 158(3):259-66.

Cador M, Bjjou Y, Cailhol S, Stinus L. 1999. D-amphetamine-induced behavioral sensitization: Implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation. *Neuroscience* 94(3):705-21.

Caine SB, Negus SS, Mello NK. 1999. Method for training operant responding and evaluating cocaine self-administration behavior in mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* 147(1):22-4.

Camarda V, Rizzi A, Calo G, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D. 2002. Pharmacological profile of hemokinin 1: A novel member of the tachykinin family. *Life Sci* 71(4):363-70.

Camarero J, Sanchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI. 2002. Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. *J Neurochem* 81(5):961-72.

Camarini R and Hodge CW. 2004. Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 79(4):623-32.

Cami J and Farre M. 2003. Drug addiction. *N Engl J Med* 349(10):975-86.

Campeau S, Liberzon I, Morilak D, Ressler K. 2011. Stress modulation of cognitive and affective processes. *Stress* 14(5):503-19.

Cancela LM, Bregonzio C, Molina VA. 1995. Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment. *Brain Res Bull* 36(3):209-13.

- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI. 1998. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392(6674):390-4.
- Capela JP, Macedo C, Branco PS, Ferreira LM, Lobo AM, Fernandes E, Remiao F, Bastos ML, Dirnagl U, Meisel A, et al. 2007. Neurotoxicity mechanisms of thioether ecstasy metabolites. *Neuroscience* 146(4):1743-57.
- Carelli RM and Wondolowski J. 2006. Anatomic distribution of reinforcer selective cell firing in the core and shell of the nucleus accumbens. *Synapse* 59(2):69-73.
- Carelli RM and Ijames SG. 2001. Selective activation of accumbens neurons by cocaine-associated stimuli during a water/cocaine multiple schedule. *Brain Res* 907(1-2):156-61.
- Carlezon WA, Jr and Nestler EJ. 2002. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: A trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* 25(12):610-5.
- Carr MJ, Hunter DD, Jacoby DB, Udem BJ. 2002. Expression of tachykinins in nonnociceptive vagal afferent neurons during respiratory viral infection in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 165(8):1071-5.
- Carter MS and Krause JE. 1990. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci* 10(7):2203-14.
- Carvalho M, Carvalho F, Remiao F, de Lourdes Pereira M, Pires-das-Neves R, de Lourdes Bastos M. 2002. Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: Influence of ambient temperature. *Arch Toxicol* 76(3):166-72.
- Carvalho MC, Masson S, Brandao ML, de Souza Silva MA. 2008. Anxiolytic-like effects of substance P administration into the dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. *Peptides* 29(7):1191-200.
- Castner SA and Goldman-Rakic PS. 1999. Long-lasting psychotomimetic consequences of repeated low-dose amphetamine exposure in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 20(1):10-28.
- Champagne D, Beaulieu J, Drolet G. 1998. CRFergic innervation of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus: A tract-tracing study. *J Neuroendocrinol* 10(2):119-31.

Chang MM, Leeman SE, Niall HD. 1971. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 232(29):86-7.

Chen X and Herbert J. 1995. The effect of long-term castration on the neuronal and physiological responses to acute or repeated restraint stress: Interactions with opioids and prostaglandins. *J Neuroendocrinol* 7(2):137-44.

Chipana C, Torres I, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E. 2008. Memantine protects against amphetamine derivatives-induced neurotoxic damage in rodents. *Neuropharmacology* 54(8):1254-63.

Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. 1991. Tachykinin (substance-P) gene expression in leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* 128(5):2441-8.

Chowdrey HS, Jessop DS, Lightman SL. 1990. Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat. *Neuroendocrinology* 52(1):90-3.

Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. 2000. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 106(4):713-22.

Chu JM, Chen LW, Chan YS, Yung KK. 2011. Neuroprotective effects of neurokinin receptor one in dopaminergic neurons are mediated through akt/PKB cell signaling pathway. *Neuropharmacology* 61(8):1389-98.

Colado MI and Green AR. 1994. A study of the mechanism of MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds. *Br J Pharmacol* 111(1):131-6.

Colado MI, Williams JL, Green AR. 1995. The hyperthermic and neurotoxic effects of 'ecstasy' (MDMA) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDA) in the dark agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol* 115(7):1281-9.

Colado MI, Camarero J, Mehan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green AR. 2001. A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134(8):1711-23.

Collins RJ, Weeks JR, Cooper MM, Good PI, Russell RR. 1984. Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. *Psychopharmacology (Berl)* 82(1-2):6-13.

Cone RD, Mountjoy KG, Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Roselli-Reh fuss L, Mortrud MT. 1993. Cloning and functional characterization of a family of receptors for the melanotropic peptides. *Ann N Y Acad Sci* 680:342-63.

Conrad CD. 2010. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(5):742-55.

Corbille AG, Valjent E, Marsicano G, Ledent C, Lutz B, Herve D, Girault JA. 2007. Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. *J Neurosci* 27(26):6937-47.

Corchero J, Fuentes JA, Manzanares J. 1997. Delta 9-tetrahydrocannabinol increases proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 323(2-3):193-5.

Corchero J, Avila MA, Fuentes JA, Manzanares J. 1997. Delta-9-tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci* 61(4):PL 39-43.

Cottrell GS, Padilla B, Pikios S, Roosterman D, Steinhoff M, Gehringer D, Grady EF, Bunnett NW. 2006. Ubiquitin-dependent down-regulation of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem* 281(38):27773-83.

Crabbe JC. 2002. Genetic contributions to addiction. *Annu Rev Psychol* 53:435-62.

Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK. 1999. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: Recent progress and future directions. *Trends Neurosci* 22(4):173-9.

Croci T, Aureggi G, Manara L, Emonds-Alt X, Le Fur G, Maffrand JP, Mukenge S, Ferla G. 1998. In vitro characterization of tachykinin NK2-receptors modulating motor responses of human colonic muscle strips. *Br J Pharmacol* 124(6):1321-7.

Croiset G, Nijssen MJ, KampHuis PJ. 2000. Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and the autonomic nervous system in learning and memory. *Eur J Pharmacol* 405(1-3):225-34.

Culman J, Klee S, Ohlendorf C, Unger T. 1997. Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J Pharmacol Exp Ther* 280(1):238-46.

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(7):1355-68.

Cunningham CL and Noble D. 1992. Conditioned activation induced by ethanol: Role in sensitization and conditioned place preference. *PHarmacol Biochem Behav* 43(1):307-13.

Dableh LJ, Yashpal K, Rochford J, Henry JL. 2005. Antidepressant-like effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. *Eur J PHarmacol* 507(1-3):99-105.

Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH. 1989. The dopamine D2 receptor: Two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8(13):4025-34.

Dallman MF and Jones MT. 1973. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: Effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* 92(5):1367-75.

Dal-Zotto S, Marti O, Delgado R, Armario A. 2004. Potentiation of glucocorticoid release does not modify the long-term effects of a single exposure to immobilization stress. *Psychopharmacology (Berl)* 177(1-2):230-7.

Daniela E, Gittings D, Schenk S. 2006. Conditioning following repeated exposure to MDMA in rats: Role in the maintenance of MDMA self-administration. *Behav Neurosci* 120(5):1144-50.

Dautzenberg FM, Braun S, Hauger RL. 2001. GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: A potential mechanism regulating stress adaptation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(4):R935-46.

Daza-Losada M, Ribeiro Do Couto B, Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J. 2007. Rewarding effects and reinstatement of MDMA-induced CPP in adolescent mice. *Neuropsychopharmacology* 32(8):1750-9.

De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Laird JM, Belmonte C, Cervero F, Hunt SP. 1998. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 392(6674):394-7.

de Kloet ER. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 37(2):51-68.



de Kloet ER, Reul JM, Sutanto W. 1990. Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(3):387-94.

de la Torre R, Ortuno J, Mas M, Farre M, Segura J. 1999. Fatal MDMA intoxication. *Lancet* 353(9152):593.

de la Torre R, Farre M, Roset PN, Lopez CH, Mas M, Ortuno J, Menoyo E, Pizarro N, Segura J, Cami J. 2000. PHarmacology of MDMA in humans. *Ann N Y Acad Sci* 914:225-37.

De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Raaso H, Vanderschuren LJ. 2002. Relapse to cocaine- and heroin-seeking behavior mediated by dopamine D2 receptors is time-dependent and associated with behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology* 26(1):18-26.

Degoulet M, Rouillon C, Rostain JC, David HN, Abiraini JH. 2008. Modulation by the dorsal, but not the ventral, hippocampus of the expression of behavioural sensitization to amphetamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 11(4):497-508.

Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. 2005. Exogenous administration of substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(4):271-80.

Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11(5):339-50.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305(5686):1014-7.

Di Chiara G. 2002. Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 137(1-2):75-114.

Di Chiara G and Imperato A. 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14):5274-8.

Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, Sokoloff P. 2000. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20(23):8677-84.

Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP. 2010. Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain Cogn* 72(1):114-23.

D'Souza MS and Markou A. 2010. Neural substrates of psychostimulant withdrawal-induced anhedonia. *Curr Top Behav Neurosci* 3:119-78.

Dunn AJ and Berridge CW. 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: Is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Brain Res Rev* 15(2):71-100.

Ebner K and Singewald N. 2006. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* 31(3):251-72.

Ebner K, Muigg P, Singewald G, Singewald N. 2008. Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. *Ann N Y Acad Sci* 1144:61-73.

Ebstein RP, Benjamin J, Belmaker RH. 2000. Personality and polymorphisms of genes involved in aminergic neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 410(2-3):205-14.

Ellenbroek BA, van der Kam EL, van der Elst MC, Cools AR. 2005. Individual differences in drug dependence in rats: The role of genetic factors and life events. *Eur J Pharmacol* 526(1-3):251-8.

Elliott PJ and Iversen SD. 1986. Behavioural effects of tachykinins and related peptides. *Brain Res* 381(1):68-76.

Engeland WC and Arnhold MM. 2005. Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28(3):325-32.

Escobedo I, O'Shea E, Orió L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R, Farre M, Green AR, Colado MI. 2005. A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol* 144(2):231-41.

Everitt BJ and Robbins TW. 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8(11):1481-9.

Everitt BJ and Wolf ME. 2002. Psychomotor stimulant addiction: A neural systems perspective. *J Neurosci* 22(9):3312-20.

Fan GH, Wang LZ, Qiu HC, Ma L, Pei G. 1999. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol* 56(1):39-45.

Fantegrossi WE. 2007. Reinforcing effects of methylenedioxy amphetamine congeners in rhesus monkeys: Are intravenous self-administration experiments relevant to MDMA neurotoxicity? *Psychopharmacology (Berl)* 189(4):471-82.

Fantegrossi WE, Ciullo JR, Wakabayashi KT, De La Garza R, 2nd, Traynor JR, Woods JH. 2008. A comparison of the physiological, behavioral, neurochemical and microglial effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the mouse. *Neuroscience* 151(2):533-43.

Fantegrossi WE, Woolverton WL, Kilbourn M, Sherman P, Yuan J, Hatzidimitriou G, Ricaurte GA, Woods JH, Winger G. 2004. Behavioral and neurochemical consequences of long-term intravenous self-administration of MDMA and its enantiomers by rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 29(7):1270-81.

Farre M, de la Torre R, Mathuna BO, Roset PN, Peiro AM, Torrens M, Ortuno J, Pujadas M, Cami J. 2004. Repeated doses administration of MDMA in humans: Pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)* 173(3-4):364-75.

File SE. 1997. Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 58(3):747-52.

Fioramonti J, Gaultier E, Toulouse M, Sanger GJ, Bueno L. 2003. Intestinal antinociceptive behaviour of NK3 receptor antagonism in conscious rats: Evidence to support a peripheral mechanism of action. *Neurogastroenterol Motil* 15(4):363-9.

Fisher AS, Stewart RJ, Yan T, Hunt SP, Stanford SC. 2007. Disruption of noradrenergic transmission and the behavioural response to a novel environment in NK1R<sup>-/-</sup> mice. *Eur J Neurosci* 25(4):1195-204.

Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestler EJ. 1996. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: Common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 16(1):274-82.

Fone KC, Beckett SR, Topham IA, Swettenham J, Ball M, Maddocks L. 2002. Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. *Psychopharmacology (Berl)* 159(4):437-44.

Fornai F, Gesi M, Lenzi P, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Pellegrini A, Battaglia G, Ruggieri S, Paparelli A. 2004. Effects of repeated low doses of MDMA on EEG activity and fluoro-jade B histochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1025:181-8.

Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, Lieb K, Korc M, Palma C, Zimmermann A, et al. 2003. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 83(5):731-42.

Gadd CA, Murtra P, De Felipe C, Hunt SP. 2003. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the amygdala modulate morphine reward and anxiety behaviors in the mouse. *J Neurosci* 23(23):8271-80.

Gal K and Gyertyan I. 2006. Dopamine D3 as well as D2 receptor ligands attenuate the cue-induced cocaine-seeking in a relapse model in rats. *Drug Alcohol Depend* 81(1):63-70.

Gallo-Payet N and Payet MD. 2003. Mechanism of action of ACTH: Beyond cAMP. *Microsc Res Tech* 61(3):275-87.

Gangarossa G, Espallergues J, de Kerchove d'Exaerde A, El Mestikawy S, Gerfen CR, Herve D, Girault JA, Valjent E. 2013. Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Front Neural Circuits* 7:22.

Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S, Armario A. 2000. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72(2):114-25.

Garcia-Perez D, Nunez C, Laorden ML, Milanes MV. 2016. Regulation of dopaminergic markers expression in response to acute and chronic morphine and to morphine withdrawal. *Addict Biol* 21(2):374-86.

Gardner EL. 2002. Addictive potential of cannabinoids: The underlying neurobiology. *Chem Phys Lipids* 121(1-2):267-90.

Gerfen CR. 1991. Substance P (neurokinin-1) receptor mRNA is selectively expressed in cholinergic neurons in the striatum and basal forebrain. *Brain Res* 556(1):165-70.

Gerfen CR and Engber TM. 1992. Molecular neuroanatomic mechanisms of parkinson's disease: A proposed therapeutic approach. *Neurol Clin* 10(2):435-49.

Goeders NE. 2002. Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 301(3):785-9.

---

Goldstein DS and McEwen B. 2002. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 5(1):55-8.

Goldstein RZ and Volkow ND. 2002. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159(10):1642-52.

Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE. 2000. Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 141(11):4218-25.

Gouzoulis-Mayfrank E and Daumann J. 2009. Neurotoxicity of drugs of abuse--the case of methylenedioxyamphetamines (MDMA, ecstasy), and amphetamines. *Dialogues Clin Neurosci* 11(3):305-17.

Granado N, Escobedo I, O'Shea E, Colado I, Moratalla R. 2008a. Early loss of dopaminergic terminals in striosomes after MDMA administration to mice. *Synapse* 62(1):80-4.

Granado N, O'Shea E, Bove J, Vila M, Colado MI, Moratalla R. 2008b. Persistent MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum and substantia nigra of mice. *J Neurochem* 107(4):1102-12.

Granado N, Ares-Santos S, Oliva I, O'Shea E, Martin ED, Colado MI, Moratalla R. 2011. Dopamine D2-receptor knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA. *Neurobiol Dis* 42(3):391-403.

Green AR, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI. 2005. Studies on the effect of MDMA ('ecstasy') on the body temperature of rats housed at different ambient room temperatures. *Br J Pharmacol* 146(2):306-12.

Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. 2003. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* 55(3):463-508.

Green AR, Sanchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI. 2004. Effect of ambient temperature and a prior neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the hyperthermic response of rats to a single or repeated ('binge' ingestion) low dose of MDMA. *Psychopharmacology (Berl)* 173(3-4):264-9.

Guegan T, Cebria JP, Maldonado R, Martin M. 2015. Morphine-induced locomotor sensitization produces structural plasticity in the mesocorticolimbic system dependent on CB1-R activity. *Addict Biol* .

Gurtman CG, Morley KC, Li KM, Hunt GE, McGregor IS. 2002. Increased anxiety in rats after 3,4-methylenedioxymethamphetamine: Association with serotonin depletion. *Eur J Pharmacol* 446(1-3):89-96.

Hardin JM HJ. 2003. Generalized estimating equations. *Generalized Estimating Equations* .

Hascoet M, Bourin M, Nic Dhonnchadha BA. 2001. The mouse light-dark paradigm: A review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(1):141-66.

Hasenohrl RU, Gerhardt P, Huston JP. 1991. Naloxone blocks conditioned place preference induced by substance P and [pGlu6]-SP(6-11). *Regul Pept* 35(3):177-87.

Hauger RL, Lorang M, Irwin M, Aguilera G. 1990. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res* 532(1-2):34-40.

Hauger RL, Millan MA, Lorang M, Harwood JP, Aguilera G. 1988. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* 123(1):396-405.

Hedou G, Homberg J, Feldon J, Heidbreder CA. 2001. Expression of sensitization to amphetamine and dynamics of dopamine neurotransmission in different laminae of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 40(3):366-82.

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(1):74-80.

Herman JP and Cullinan WE. 1997. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20(2):78-84.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24(3):151-80.

Herpfer I and Lieb K. 2005. Substance P receptor antagonists in psychiatry: Rationale for development and therapeutic potential. *CNS Drugs* 19(4):275-93.

Hershey AD, Dykema PE, Krause JE. 1991. Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *J Biol Chem* 266(7):4366-74.

Holzer P and Holzer-Petsche U. 1997. Tachykinins in the gut. part I. expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* 73(3):173-217.

Homanics GE, Quinlan JJ, Firestone LL. 1999. Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacol Biochem Behav* 63(1):21-6.

Hunter DD, Myers AC, Udem BJ. 2000. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med* 161(6):1985-90.

Huston JP, Hasenohrl RU, Boix F, Gerhardt P, Schwarting RK. 1993. Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity. *Psychopharmacology (Berl)* 112(2-3):147-62.

Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. 1991. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350(6315):230-2.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. 2006. Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-98.

Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ. 2004. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 16(4):348-55.

Itzhak Y and Martin JL. 1999. Effects of cocaine, nicotine, dizocipiline and alcohol on mice locomotor activity: Cocaine-alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. *Brain Res* 818(2):204-11.

Itzhak Y, Ali SF, Achat CN, Anderson KL. 2003. Relevance of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 166(3):241-8.

Jackson DM and Westlind-Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64(2):291-370.

Jayanthi S, Ladenheim B, Andrews AM, Cadet JL. 1999. Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Neuroscience* 91(4):1379-87.

Jenkinson KM, Morgan JM, Furness JB, Southwell BR. 1999. Neurons bearing NK(3) tachykinin receptors in the guinea-pig ileum revealed by specific binding of fluorescently labelled agonists. *Histochem Cell Biol* 112(3):233-46.

Jentsch JD and Taylor JR. 1999. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: Implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 146(4):373-90.

Jessop DS, Renshaw D, Larsen PJ, Chowdrey HS, Harbuz MS. 2000. Substance P is involved in terminating the hypothalamo- pituitary-adrenal axis response to acute stress through centrally located neurokinin-1 receptors. *Stress* 3(3):209-20.

Jodogne C, Marinelli M, Le Moal M, Piazza PV. 1994. Animals predisposed to develop amphetamine self-administration show higher susceptibility to develop contextual conditioning of both amphetamine-induced hyperlocomotion and sensitization. *Brain Res* 657(1-2):236-44.

Johnson EA, O'Callaghan JP, Miller DB. 2002. Chronic treatment with supraphysiological levels of corticosterone enhances D-MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the C57BL/6J female mouse. *Brain Res* 933(2):130-8.

Johnson EA, Sharp DS, Miller DB. 2000. Restraint as a stressor in mice: Against the dopaminergic neurotoxicity of D-MDMA, low body weight mitigates restraint-induced hypothermia and consequent neuroprotection. *Brain Res* 875(1-2):107-18.

Johnson EA, Shvedova AA, Kisin E, O'Callaghan JP, Kommineni C, Miller DB. 2002. D-MDMA during vitamin E deficiency: Effects on dopaminergic neurotoxicity and hepatotoxicity. *Brain Res* 933(2):150-63.

Johnson M, Elayan I, Hanson GR, Foltz RL, Gibb JW, Lim HK. 1992. Effects of 3,4-dihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxymethamphetamine, two metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, on central serotonergic and dopaminergic systems. *J Pharmacol Exp Ther* 261(2):447-53.

Joyce EM and Iversen SD. 1979. The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat. *Neurosci Lett* 14(2-3):207-12.

Kadivar M, Farahmandfar M, Ranjbar FE, Zarrindast MR. 2014. Increased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity by morphine-sensitization in rat hippocampus. *Behav Brain Res* 267:74-82.



Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Metzger D, et al. 2009. Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29(50):15923-32.

Kage R, Thim L, Creutzfeldt W, Conlon JM. 1988. Post-translational processing of preprotachykinins. isolation of protachykinin-(1-37)-peptide from human adrenal-medullary pheochromocytoma tissue. *Biochem J* 253(1):203-7.

Kalivas PW and Stewart J. 1991. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16(3):223-44.

Kandere-Grzybowska K, Gheorghe D, Priller J, Esposito P, Huang M, Gerard N, Theoharides TC. 2003. Stress-induced dura vascular permeability does not develop in mast cell-deficient and neurokinin-1 receptor knockout mice. *Brain Res* 980(2):213-20.

Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. 1983. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 114(2):533-40.

Kankaanpaa A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppala T. 1998. The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 59(4):1003-9.

Kant GJ, Leu JR, Anderson SM, Mougey EH. 1987. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 40(6):775-9.

Kant GJ, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. 1983. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Sci* 33(26):2657-63.

Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson TN, 3rd, Wright WL, Covington PS. 1995. Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 57(2):359-65.

Kantor L, Hewlett GH, Gnegy ME. 1999. Enhanced amphetamine- and K<sup>+</sup>-mediated dopamine release in rat striatum after repeated amphetamine: Differential requirements for Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent phosphorylation and synaptic vesicles. *J Neurosci* 19(10):3801-8.

Katz RJ and Gormezano G. 1979. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 11(2):231-3.

Keller-Wood M, Kimura B, Shinsako J, Phillips MI. 1986. Interaction between CRF and angiotensin II in control of ACTH and adrenal steroids. *Am J Physiol* 250(3 Pt 2):R396-402.

Keller-Wood ME and Dallman MF. 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5(1):1-24.

Kelley AE and Berridge KC. 2002. The neuroscience of natural rewards: Relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22(9):3306-11.

Kennedy PG, Rodgers J, Bradley B, Hunt SP, Gettinby G, Leeman SE, de Felipe C, Murray M. 2003. Clinical and neuroinflammatory responses to meningoencephalitis in substance P receptor knockout mice. *Brain* 126(Pt 7):1683-90.

Khan I and Collins SM. 1994. Fourth isoform of preprotachykinin messenger RNA encoding for substance P in the rat intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 202(2):796-802.

Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A. 2000. Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100(4):689-99.

Kita H and Kitai ST. 1990. Amygdaloid projections to the frontal cortex and the striatum in the rat. *J Comp Neurol* 298(1):40-9.

Koehl M, Lemaire V, Mayo W, Abrous DN, Maccari S, Piazza PV, Le Moal M, Vallee M. 2002. Individual vulnerability to substance abuse and affective disorders: Role of early environmental influences. *Neurotox Res* 4(4):281-96.

Koob GF. 2008. Hedonic homeostatic dysregulation as a driver of drug-seeking behavior. *Drug Discov Today Dis Models* 5(4):207-15.

Koob GF and Le Moal M. 2008. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 59:29-53.

Koob GF and Le Moal M. 2005. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci* 8(11):1442-4.

Koob GF and Le Moal M. 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24(2):97-129.

Koob GF and Le Moal M. 1997. Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278(5335):52-8.

---

Koob GF and Bloom FE. 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242(4879):715-23.

Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. 1998. Neuroscience of addiction. *Neuron* 21(3):467-76.

Kotlinska JH, Gibula-Bruzda E, Witkowska E, Izdebski J. 2013. Involvement of delta and mu opioid receptors in the acute and sensitized locomotor action of cocaine in mice. *Peptides* 48:89-95.

Kovacs KJ and Sawchenko PE. 1996. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16(1):262-73.

Kramer HK, Poblete JC, Azmitia EC. 1998. Characterization of the translocation of protein kinase C (PKC) by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA/ecstasy) in synaptosomes: Evidence for a presynaptic localization involving the serotonin transporter (SERT). *Neuropsychopharmacology* 19(4):265-77.

Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Knowles E, et al. 1998. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281(5383):1640-5.

Krasnova IN, Ladenheim B, Hodges AB, Volkow ND, Cadet JL. 2011. Chronic methamphetamine administration causes differential regulation of transcription factors in the rat midbrain. *PLoS One* 6(4):e19179.

Krause JE, Takeda Y, Hershey AD. 1992. Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *J Invest Dermatol* 98(6 Suppl):2S-7S.

Krause JE, Bu JY, Takeda Y, Blount P, Raddatz R, Sachais BS, Chou KB, Takeda J, McCarson K, DiMaggio D. 1993. Structure, expression and second messenger-mediated regulation of the human and rat substance P receptors and their genes. *Regul Pept* 46(1-2):59-66.

Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, Chicchi GG, Liu Q. 2002. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene* 296(1-2):205-12.

LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL. 1996. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1(2):121-4.

Lai JP, Douglas SD, Rappaport E, Wu JM, Ho WZ. 1998. Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. *J Neuroimmunol* 91(1-2):121-8.

Lallemend F, Lefebvre PP, Hans G, Rigo JM, Van de Water TR, Moonen G, Malgrange B. 2003. Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca<sup>2+</sup>-MAPK/ERK pathways. *J Neurochem* 87(2):508-21.

Lamb RJ and Griffiths RR. 1987. Self-injection of d,1-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the baboon. *Psychopharmacology (Berl)* 91(3):268-72.

Larsen PJ, Jessop D, Patel H, Lightman SL, Chowdrey HS. 1993. Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotrophin via a central mechanism involving corticotrophin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 5(1):99-105.

Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski A. 2007. Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review). *Folia Neuropathol* 45(3):99-107.

Lecci A and Maggi CA. 2003. Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets* 7(3):343-62.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, et al. 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283(5400):401-4.

Lee J, Duan W, Mattson MP. 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82(6):1367-75.

Legastelois R, Botia B, Coune F, Jeanblanc J, Naassila M. 2014. Deciphering the relationship between vulnerability to ethanol-induced behavioral sensitization and ethanol consumption in outbred mice. *Addict Biol* 19(2):210-24.

Leo D, di Porzio U, Racagni G, Riva MA, Fumagalli F, Perrone-Capano C. 2007. Chronic cocaine administration modulates the expression of transcription factors involved in midbrain dopaminergic neuron function. *Exp Neurol* 203(2):472-80.

Lessov CN, Palmer AA, Quick EA, Phillips TJ. 2001. Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 155(1):91-9.

Levin N, Blum M, Roberts JL. 1989. Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expression by vasopressin in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 125(6):2957-66.

Levine HG. 1985. Situational anxiety and everyday life experiences of mildly mentally retarded adults. *Am J Ment Defic* 90(1):27-33.

Li CY, Mao X, Wei L. 2008. Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol* 4(1):e2.

Licata SC, Schmidt HD, Pierce RC. 2004. Suppressing calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the ventral tegmental area enhances the acute behavioural response to cocaine but attenuates the initiation of cocaine-induced behavioural sensitization in rats. *Eur J Neurosci* 19(2):405-14.

Lile JA, Ross JT, Nader MA. 2005. A comparison of the reinforcing efficacy of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") with cocaine in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 78(2):135-40.

Linnik MD and Moskowitz MA. 1989. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides* 10(5):957-62.

Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25(4):402-8.

Lodge DJ and Grace AA. 2008. Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: A mechanism of behavioral sensitization. *J Neurosci* 28(31):7876-82.

Logan BJ, Laverty R, Sanderson WD, Yee YB. 1988. Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 152(3):227-34.

Lomax AE and Furness JB. 2000. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 302(1):59-72.

Loweth JA, Singer BF, Baker LK, Wilke G, Inamine H, Bubula N, Alexander JK, Carlezon WA, Jr, Neve RL, Vezina P. 2010. Transient overexpression of alpha-

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the nucleus accumbens shell enhances behavioral responding to amphetamine. *J Neurosci* 30(3):939-49.

Lu L, Zeng S, Liu D, Ceng X. 2000. Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. *Neurosci Lett* 291(3):191-5.

Lundberg JM. 1996. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 48(1):113-78.

UCLA Behavioral Testing Core Facility [Internet]; c2006. Available from: <http://btc.bo1.ucla.edu/> .

Ma XM and Lightman SL. 1998. The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol* 510 ( Pt 2)(Pt 2):605-14.

Madras BK, Elmaleh DR, Meltzer PC, Liang AY, Brownell GL, Brownell AL. 1994. Positron emission tomography of cocaine binding sites on the dopamine transporter. *NIDA Res Monogr* 138:57-69.

Maeno H, Kiyama H, Tohyama M. 1993. Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 18(1-2):43-58.

Maggi CA. 2000. The troubled story of tachykinins and neurokinins. *Trends Pharmacol Sci* 21(5):173-5.

Maggi CA. 1997. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept* 70(2-3):75-90.

Maggi CA and Meli A. 1988. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 19(1):1-43.

Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, Martin JG. 2003. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: Regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(1):103-10.

Makara GB and Haller J. 2001. Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 65(4):367-90.

Makara GB, Mergl Z, Zelena D. 2004. The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: An assessment of the evidence. *Ann N Y Acad Sci* 1018:151-61.

Malberg JE and Seiden LS. 1998. Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci* 18(13):5086-94.

Malberg JE, Sabol KE, Seiden LS. 1996. Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278(1):258-67.

Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. 1997. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 388(6642):586-9.

Mantsch JR and Goeders NE. 1999. Ketoconazole blocks the stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats: Relationship to the discriminative stimulus effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 142(4):399-407.

Mantyh PW, Maggio JE, Hunt SP. 1984. The autoradiographic distribution of kassinin and substance K binding sites is different from the distribution of substance P binding sites in rat brain. *Eur J Pharmacol* 102(2):361-4.

Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. 1999. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res* 839(1):173-9.

Markou A, Arroyo M, Everitt BJ. 1999. Effects of contingent and non-contingent cocaine on drug-seeking behavior measured using a second-order schedule of cocaine reinforcement in rats. *Neuropsychopharmacology* 20(6):542-55.

Marona-Lewicka D, Rhee GS, Sprague JE, Nichols DE. 1996. Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. *Pharmacol Biochem Behav* 53(1):99-105.

Marquez C, Nadal R, Armario A. 2006. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behav Brain Res* 168(1):13-22.

Marquez C, Nadal R, Armario A. 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: Individual differences. *Neuroscience* 123(3):601-12.

Marquez C, Belda X, Armario A. 2002. Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res* 926(1-2):181-5.

Marston HM, Reid ME, Lawrence JA, Olverman HJ, Butcher SP. 1999. Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 144(1):67-76.

Marti O and Armario A. 1998. Anterior pituitary response to stress: Time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16(3-4):241-60.

Marti O, Andres R, Armario A. 1999. Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: Dependence on glucocorticoid status. *Am J Physiol* 277(3 Pt 2):R869-77.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2000. Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci* 12(11):4038-46.

Massi M, Panocka I, de Caro G. 2000. The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 21(11):1597-609.

Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M, Nagase H. 1999. Involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Brain Res* 835(2):298-305.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, et al. 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383(6603):819-23.

McClung CA and Nestler EJ. 2003. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* 6(11):1208-15.

McCutcheon JE, Fisher AS, Guzdar E, Wood SA, Lightman SL, Hunt SP. 2008. Genetic background influences the behavioural and molecular consequences of neurokinin-1 receptor knockout. *Eur J Neurosci* 27(3):683-90.



McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW. 2004. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci* 24(7):1551-60.

McNamara MG, Kelly JP, Leonard BE. 1995. Some behavioural and neurochemical aspects of subacute (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52(3):479-84.

Meador-Woodruff JH. 1994. Update on dopamine receptors. *Ann Clin Psychiatry* 6(2):79-90.

Mechan AO, Moran PM, Elliott M, Young AJ, Joseph MH, Green R. 2002a. A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field. *Psychopharmacology (Berl)* 159(2):167-75.

Mechan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR. 2002b. The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. *Br J Pharmacol* 135(1):170-80.

Mello DM, Marcinichen DR, Madruga D, Branco R, Paschoalini MA, De Lima TC. 2007. Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P. *Behav Brain Res* 181(2):232-8.

Meng M, Zhao X, Dang Y, Ma J, Li L, Gu S. 2013. Region-specific expression of brain-derived neurotrophic factor splice variants in morphine conditioned place preference in mice. *Brain Res* 1519:53-62.

Mickiewicz AL, Dallimore JE, Napier TC. 2009. The ventral pallidum is critically involved in the development and expression of morphine-induced sensitization. *Neuropsychopharmacology* 34(4):874-86.

Miller DB and O'Callaghan JP. 1995. The role of temperature, stress, and other factors in the neurotoxicity of the substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine and fenfluramine. *Mol Neurobiol* 11(1-3):177-92.

Miller DB and O'Callaghan JP. 1994. Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270(2):752-60.

Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175(1):43-50.

Minneman KP. 2001. Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol Interv* 1(2):108-16.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 78(1):189-225.

Mitra R, Vyas A, Chatterjee G, Chattarji S. 2005. Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. *Neurosci Lett* 383(3):278-83.

Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. 1980. From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14(2-3):69-97.

Montmayeur JP, Bausero P, Amlaiky N, Maroteaux L, Hen R, Borrelli E. 1991. Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Lett* 278(2):239-43.

Morcuende S, Gadd CA, Peters M, Moss A, Harris EA, Sheasby A, Fisher AS, De Felipe C, Mantyh PW, Rupniak NM, et al. 2003. Increased neurogenesis and brain-derived neurotrophic factor in neurokinin-1 receptor gene knockout mice. *Eur J Neurosci* 18(7):1828-36.

Morgan MJ, McFie L, Fleetwood H, Robinson JA. 2002. Ecstasy (MDMA): Are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence? *Psychopharmacology (Berl)* 159(3):294-303.

Morley KC, Gallate JE, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS. 2001. Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Eur J Pharmacol* 433(1):91-9.

Morteau O, Lu B, Gerard C, Gerard NP. 2001. Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. *Nat Immunol* 2(12):1088.

Moussaoui SM, Le Prado N, Bonici B, Faucher DC, Cuine F, Laduron PM, Garret C. 1992. Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: Comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience* 48(4):969-78.

Moyer RA, Wang D, Papp AC, Smith RM, Duque L, Mash DC, Sadee W. 2011. Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D2 receptor are associated with cocaine abuse. *Neuropsychopharmacology* 36(4):753-62.

Mukerji I, Ramkissoon SH, Reddy KK, Rameshwar P. 2005. Autocrine proliferation of neuroblastoma cells is partly mediated through neurokinin receptors: Relevance to bone marrow metastasis. *J Neurooncol* 71(2):91-8.

Murtra P, Sheasby AM, Hunt SP, De Felipe C. 2000. Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 405(6783):180-3.

Mussap CJ, Geraghty DP, Burcher E. 1993. Tachykinin receptors: A radioligand binding perspective. *J Neurochem* 60(6):1987-2009.

Myers AC, Kajekar R, Udem BJ. 2002. Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(4):L775-81.

Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. 1994. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 347(2):249-74.

Naline E, Devillier P, Drapeau G, Toty L, Bakdach H, Regoli D, Advenier C. 1989. Characterization of neurokinin effects and receptor selectivity in human isolated bronchi. *Am Rev Respir Dis* 140(3):679-86.

Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN. 1988. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 43(1):41-6.

Navari RM, Reinhardt RR, Gralla RJ, Kris MG, Hesketh PJ, Khojasteh A, Kindler H, Grote TH, Pendergrass K, Grunberg SM, et al. 1999. Reduction of cisplatin-induced emesis by a selective neurokinin-1-receptor antagonist. L-754,030 antiemetic trials group. *N Engl J Med* 340(3):190-5.

Navarro M, Chowen J, Rocio A Carrera M, del Arco I, Villanua MA, Martin Y, Roberts AJ, Koob GF, de Fonseca FR. 1998. CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* 9(15):3397-402.

Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, del Arco I, Villanua MA, et al. 2001. Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci* 21(14):5344-50.

Nazarian A, Russo SJ, Festa ED, Kraish M, Quinones-Jenab V. 2004. The role of D1 and D2 receptors in the cocaine conditioned place preference of male and female rats. *Brain Res Bull* 63(4):295-9.

Nestler EJ. 2004. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25(4):210-8.

Nestler EJ. 2001a. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10(3):201-17.

Nestler EJ. 2001b. Neurobiology. total recall-the memory of addiction. *Science* 292(5525):2266-7.

Nestler EJ. 1994. Molecular neurobiology of drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 11(2):77-87.

Nestler EJ, Kelz MB, Chen J. 1999. DeltaFosB: A molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835(1):10-7.

Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. 1993. Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11(6):995-1006.

NIDA Notes. 2002. Study sheds light on progression to drug dependence. National Institute on Drug Abuse: .

Nikolaus S, Huston JP, Hasenohrl RU. 1999. Reinforcing effects of neurokinin substance P in the ventral pallidum: Mediation by the tachykinin NK1 receptor. *Eur J Pharmacol* 370(2):93-9.

Nye HE and Nestler EJ. 1996. Induction of chronic fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol* 49(4):636-45.

Oades RD and Halliday GM. 1987. Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. 1. anatomy and connectivity. *Brain Res* 434(2):117-65.

O'Brien MS and Anthony JC. 2005. Risk of becoming cocaine dependent: Epidemiological estimates for the united states, 2000-2001. *Neuropsychopharmacology* 30(5):1006-18.

O'Callaghan JP and Miller DB. 1994. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270(2):741-51.

O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, Molliver ME. 1988. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: Immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci* 8(8):2788-803.

Ojeda V, Fuentealba JA, Galleguillos D, Andres ME. 2003. Rapid increase of Nurr1 expression in the substantia nigra after 6-hydroxydopamine lesion in the striatum of the rat. *J Neurosci Res* 73(5):686-97.

OLDS J and MILNER P. 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47(6):419-27.

Omelchenko N and Sesack SR. 2007. Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. *Neuroscience* 146(3):1259-74.

Omelchenko N and Sesack SR. 2005. Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483(2):217-35.

O'Shea E, Easton N, Fry JR, Green AR, Marsden CA. 2002. Protection against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurodegeneration produced by glutathione depletion in rats is mediated by attenuation of hyperthermia. *J Neurochem* 81(4):686-95.

O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI. 2001. Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology* 40(1):65-74.

Otsuka M, Konishi S, Yanagisawa M, Tsunoo A, Akagi H. 1982. Role of substance P as a sensory transmitter in spinal cord and sympathetic ganglia. *Ciba found Symp* (91)(91):13-34.

Owens MJ and Nemeroff CB. 1991. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 43(4):425-73.

Pacak K and Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4):502-48.

Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: A test of selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275(4 Pt 2):R1247-55.

Page NM. 2010. Neurokinin B and pre-eclampsia: A decade of discovery. *Reprod Biol Endocrinol* 8:4,7827-8-4.

Page NM. 2004. Hemokininins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* 61(13):1652-63.

Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, Lowry PJ. 2003. Characterization of the endokinins: Human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):6245-50.

Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA. 1999. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer* 79(2):236-43.

Palmer CL, Cotton L, Henley JM. 2005. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 57(2):253-77.

Palumbo ML, Zorrilla Zubilete MA, Cremaschi GA, Genaro AM. 2009. Different effect of chronic stress on learning and memory in BALB/c and C57BL/6 inbred mice: Involvement of hippocampal NO production and PKC activity. *Stress* 12(4):350-61.

[Internet]. Available from: <http://www.panlab.com/es/> .

Parrott AC. 2012. MDMA and 5-HT neurotoxicity: The empirical evidence for its adverse effects in humans - no need for translation. *Br J Pharmacol* 166(5):1518,20; discussion 1521-2.

Parrott AC, Sisk E, Turner JJ. 2000. Psychobiological problems in heavy 'ecstasy' (MDMA) polydrug users. *Drug Alcohol Depend* 60(1):105-10.

Pascual DW and Bost KL. 1990. Substance P production by P388D1 macrophages: A possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology* 71(1):52-6.

Patacchini R and Maggi CA. 2001. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur J Pharmacol* 429(1-3):13-21.

Patacchini R and Maggi CA. 1995. Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329(1):161-84.

Patacchini R, De Giorgio R, Bartho L, Barbara G, Corinaldesi R, Maggi CA. 1998. Evidence that tachykinins are the main NANC excitatory neurotransmitters in the guinea-pig common bile duct. *Br J Pharmacol* 124(8):1703-11.

Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martin JD, Flores C, Mantecon AG, Story ME, Pinto FM. 2003. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol* 139(3):523-32.

Patak EN, Pennefather JN, Story ME. 2000. Effects of tachykinins on uterine smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27(11):922-7.

Paulson PE, Camp DM, Robinson TE. 1991. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 103(4):480-92.

Paulus MP, Dulawa SC, Ralph RJ, Mark AG. 1999. Behavioral organization is independent of locomotor activity in 129 and C57 mouse strains. *Brain Res* 835(1):27-36.

Peinado JR, Laurent V, Lee SN, Peng BW, Pintar JE, Steiner DF, Lindberg I. 2005. Strain-dependent influences on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis profoundly affect the 7B2 and PC2 null phenotypes. *Endocrinology* 146(8):3438-44.

Pennefather JN, Zeng XP, Gould D, Hall S, Burcher E. 1993. Mammalian tachykinins stimulate rat uterus by activating NK-2 receptors. *Peptides* 14(2):169-74.

Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: A growing family. *Life Sci* 74(12):1445-63.

Pernow B. 1983. Substance P. *Pharmacol Rev* 35(2):85-141.

Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR, et al. 2008. Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* 62(5):358-69.

Phillips AG and Fibiger HC. 1990. Role of reward and enhancement of conditioned reward in persistence of responding for cocaine. *Behav Pharmacol* 1(4):269-82.

Phillips TJ, Dickinson S, Burkhart-Kasch S. 1994. Behavioral sensitization to drug stimulant effects in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Behav Neurosci* 108(4):789-803.

Phillips TJ, Crabbe JC, Metten P, Belknap JK. 1994. Localization of genes affecting alcohol drinking in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 18(4):931-41.

Piazza PV and Deroche-Gamonet V. 2013. A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 229(3):387-413.

Piazza PV and Le Moal M. 1997. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: Physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 25(3):359-72.

Piazza PV and Le Moal ML. 1996. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: Role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:359-78.

Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H. 1989. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245(4925):1511-3.

Piazza PV, Maccari S, Deminiere JM, Le Moal M, Mormede P, Simon H. 1991. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6):2088-92.

Piazza PV, Deminiere JM, Maccari S, Mormede P, Le Moal M, Simon H. 1990. Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav Pharmacol* 1(4):339-45.

Pierce RC and Kumaresan V. 2006. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):215-38.

Pierce RC and Kalivas PW. 1997. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25(2):192-216.

Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, Hidalgo A, Baamonde A, Sanchez T, Candenas ML. 2003. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod* 69(3):940-6.

Pitchers KK, Vialou V, Nestler EJ, Laviolette SR, Lehman MN, Coolen LM. 2013. Natural and drug rewards act on common neural plasticity mechanisms with DeltaFosB as a key mediator. *J Neurosci* 33(8):3434-42.

Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. 1996. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382(6588):255-7.

Post RM, Weiss SR, Fontana D, Pert A. 1992. Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 654:386-99.



Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. 2004. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 155(1):135-46.

Prat A, Picard P, Couture R. 1994. Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered neuropeptide K in the rat: Receptor characterization. *Br J Pharmacol* 112(1):250-6.

Pratt WB. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268(29):21455-8.

Pulvirenti L and Diana M. 2001. Drug dependence as a disorder of neural plasticity: Focus on dopamine and glutamate. *Rev Neurosci* 12(2):141-58.

Quadros IM, Nobrega JN, Hipolide DC, de Lucca EM, Souza-Formigoni ML. 2002a. Differential propensity to ethanol sensitization is not associated with altered binding to D1 receptors or dopamine transporters in mouse brain. *Addict Biol* 7(3):291-9.

Quadros IM, Hipolide DC, Frussa-Filho R, De Lucca EM, Nobrega JN, Souza-Formigoni ML. 2002b. Resistance to ethanol sensitization is associated with increased NMDA receptor binding in specific brain areas. *Eur J Pharmacol* 442(1-2):55-61.

Quartara L and Maggi CA. 1998. The tachykinin NK1 receptor. part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides* 32(1):1-49.

Quartara L and Maggi CA. 1997. The tachykinin NK1 receptor. part I: Ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 31(6):537-63.

Ranaldi R, Bauco P, McCormick S, Cools AR, Wise RA. 2001. Equal sensitivity to cocaine reward in addiction-prone and addiction-resistant rat genotypes. *Behav Pharmacol* 12(6-7):527-34.

Ratzenboeck E, Saria A, Kriechbaum N, Zernig G. 2001. Reinforcing effects of MDMA ("ecstasy") in drug-naive and cocaine-trained rats. *Pharmacology* 62(3):138-44.

Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 46(4):551-99.

Renthal W and Nestler EJ. 2009. Chromatin regulation in drug addiction and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 11(3):257-68.

Reul JM and de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117(6):2505-11.

Reveron ME, Monks TJ, Duvauchelle CL. 2005. Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 26(6):1031-40.

Rezayof A, Zarrindast MR, Sahraei H, Haeri-Rohani AH. 2002. Involvement of dopamine D2 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Pharmacol Biochem Behav* 74(1):187-97.

Rice MC and O'Brien SJ. 1980. Genetic variance of laboratory outbred swiss mice. *Nature* 283(5743):157-61.

Ripley TL, Gadd CA, De Felipe C, Hunt SP, Stephens DN. 2002. Lack of self-administration and behavioural sensitisation to morphine, but not cocaine, in mice lacking NK1 receptors. *Neuropharmacology* 43(8):1258-68.

Rivier C and Vale W. 1987. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: A pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology* 121(4):1320-8.

Rivier C and Vale W. 1983. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305(5932):325-7.

Rivier C, Rivier J, Vale W. 1982. Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* 218(4570):377-9.

Robbins TW and Everitt BJ. 1999. Drug addiction: Bad habits add up. *Nature* 398(6728):567-70.

Robbins TW, Everitt BJ, Nutt DJ. 2008. Introduction. the neurobiology of drug addiction: New vistas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1507):3109-11.

Roberts DC, Brebner K, Vincler M, Lynch WJ. 2002. Patterns of cocaine self-administration in rats produced by various access conditions under a discrete trials procedure. *Drug Alcohol Depend* 67(3):291-9.

Robinson TE. 2004. Neuroscience. addicted rats. *Science* 305(5686):951-3.

Robinson TE and Berridge KC. 2008. Review. the incentive sensitization theory of addiction: Some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1507):3137-46.

---

Robinson TE and Kolb B. 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46.

Robinson TE and Berridge KC. 2003. Addiction. *Annu Rev Psychol* 54:25-53.

Robinson TE and Berridge KC. 2000. The psychology and neurobiology of addiction: An incentive-sensitization view. *Addiction* 95 Suppl 2:S91-117.

Robinson TE and Kolb B. 1999a. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33(2):160-2.

Robinson TE and Kolb B. 1999b. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11(5):1598-604.

Robinson TE and Kolb B. 1997. Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17(21):8491-7.

Robinson TE and Berridge KC. 1993. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18(3):247-91.

Robinson TE and Becker JB. 1986. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396(2):157-98.

Robledo P, Mendizabal V, Ortuno J, de la Torre R, Kieffer BL, Maldonado R. 2004. The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. *Eur J Neurosci* 20(3):853-8.

Romero LM and Sapolsky RM. 1996. Patterns of ACTH secretagog secretion in response to psychological stimuli. *J Neuroendocrinol* 8(4):243-58.

Rothman RB and Baumann MH. 2003. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479(1-3):23-40.

Rupniak NM and Kramer MS. 1999. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 20(12):485-90.

Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, de Felipe C, Hunt S, Wheeldon A. 2000. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P

(NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology* 39(8):1413-21.

Rupniak NM, Carlson EJ, Webb JK, Harrison T, Porsolt RD, Roux S, de Felipe C, Hunt SP, Oates B, Wheeldon A. 2001. Comparison of the phenotype of NK1R<sup>-/-</sup> mice with pharmacological blockade of the substance P (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. *Behav Pharmacol* 12(6-7):497-508.

Sachais BS and Krause JE. 1994. Both extracellular and transmembrane residues contribute to the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonist WIN 51708. *Mol Pharmacol* 46(1):122-8.

Saffroy M, Torrens Y, Glowinski J, Beaujouan JC. 2003. Autoradiographic distribution of tachykinin NK2 binding sites in the rat brain: Comparison with NK1 and NK3 binding sites. *Neuroscience* 116(3):761-73.

Saint-Preux F, Bores LR, Tulloch I, Ladenheim B, Kim R, Thanos PK, Volkow ND, Cadet JL. 2013. Chronic co-administration of nicotine and methamphetamine causes differential expression of immediate early genes in the dorsal striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 243:89-96.

Salthun-Lassalle B, Traver S, Hirsch EC, Michel PP. 2005. Substance P, neurokinins A and B, and synthetic tachykinin peptides protect mesencephalic dopaminergic neurons in culture via an activity-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 68(5):1214-24.

Sanchez V, Camarero J, O'Shea E, Green AR, Colado MI. 2003. Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats. *Neuropharmacology* 44(4):449-61.

Sanchez V, O'shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR. 2004. Effect of repeated ('binge') dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. *J Psychopharmacol* 18(3):412-6.

Santarelli L, Gobbi G, Blier P, Hen R. 2002. Behavioral and physiologic effects of genetic or pharmacologic inactivation of the substance P receptor (NK1). *J Clin Psychiatry* 63 Suppl 11:11-7.

Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ. 2001. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):1912-7.

Saphier D, Welch JE, Farrar GE, Nguyen NQ, Aguado F, Thaller TR, Knight DS. 1994. Interactions between serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and substance P in the CNS regulation of adrenocortical secretion. *Psychoneuroendocrinology* 19(8):779-97.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21(1):55-89.

Sapolsky RM, Stein-Behrens BA, Armanini MP. 1991. Long-term adrenalectomy causes loss of dentate gyrus and pyramidal neurons in the adult hippocampus. *Exp Neurol* 114(2):246-9.

Scearce-Levie K, Viswanathan SS, Hen R. 1999. Locomotor response to MDMA is attenuated in knockout mice lacking the 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 141(2):154-61.

Schenk S and Gittings D. 2003. Effects of SCH 23390 and eticlopride on cocaine-seeking produced by cocaine and WIN 35,428 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168(1-2):118-23.

Schenk S, Hely L, Lake B, Daniela E, Gittings D, Mash DC. 2007. MDMA self-administration in rats: Acquisition, progressive ratio responding and serotonin transporter binding. *Eur J Neurosci* 26(11):3229-36.

Schmidt CJ and Taylor VL. 1990. Reversal of the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine by 5-HT uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol* 181(1-2):133-6.

Schmidt CJ, Black CK, Abbate GM, Taylor VL. 1990. Methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity are independently mediated by 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Brain Res* 529(1-2):85-90.

Segura M, Ortuno J, Farre M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Segura J, et al. 2001. 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol* 14(9):1203-8.

Self DW. 2004. Regulation of drug-taking and -seeking behaviors by neuroadaptations in the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:242-55.

Sepehrizadeh Z, Bahrololoumi Shapourabadi M, Ahmadi S, Hashemi Bozchlou S, Zarrindast MR, Sahebgharani M. 2008. Decreased AMPA GluR2, but not GluR3,

mRNA expression in rat amygdala and dorsal hippocampus following morphine-induced behavioural sensitization. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(11):1321-30.

Sesack SR, Aoki C, Pickel VM. 1994. Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci* 14(1):88-106.

Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54(2):285-322.

Sewer MB and Waterman MR. 2003. CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. *J Biol Chem* 278(10):8106-11.

Shaham Y, Erb S, Stewart J. 2000. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: A review. *Brain Res Brain Res Rev* 33(1):13-33.

Shinonaga Y, Takada M, Mizuno N. 1994. Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* 58(2):389-97.

Shulgin AT. 1986. The background and chemistry of MDMA. *J Psychoactive Drugs* 18(4):291-304.

Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN, O'Donohue TL. 1984. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* 5(6):1097-128.

Shults CW, Quirion R, Jensen RT, Moody TW, O'Donohue TL, Chase TN. 1982. Autoradiographic localization of substance P receptors using <sup>125</sup>I substance P. *Peptides* 3(6):1073-5.

Simon C, Portalier P, Chamoin MC, Ternaux JP. 1992. Substance P like-immunoreactivity release from enterochromaffin cells of rat caecum mucosa. inhibition by serotonin and calcium-free medium. *Neurochem Int* 20(4):529-36.

Singh AS, Caplan A, Corcoran KE, Fernandez JS, Preziosi M, Rameshwar P. 2006. Oncogenic and metastatic properties of preprotachykinin-I and neurokinin-1 genes. *Vascul Pharmacol* 45(4):235-42.

Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, Mosenthal A, Rameshwar P. 2000. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin

receptors in human breast cancer cells: Implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1):388-93.

Slikker W, Jr, Holson RR, Ali SF, Kolta MG, Paule MG, Scallet AC, McMillan DE, Bailey JR, Hong JS, Scalzo FM. 1989. Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicology* 10(3):529-42.

Sola C, Tusell JM, Serratos J. 1999. Comparative study of the distribution of calmodulin kinase II and calcineurin in the mouse brain. *J Neurosci Res* 57(5):651-62.

Soria G, Castane A, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2006. The lack of A2A adenosine receptors diminishes the reinforcing efficacy of cocaine. *Neuropsychopharmacology* 31(5):978-87.

Souza-Formigoni ML, De Lucca EM, Hipolide DC, Enns SC, Oliveira MG, Nobrega JN. 1999. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)* 146(3):262-7.

Spijker S, Houtzager SW, De Gunst MC, De Boer WP, Schoffelmeer AN, Smit AB. 2004. Morphine exposure and abstinence define specific stages of gene expression in the rat nucleus accumbens. *FASEB J* 18(7):848-50.

Steketee JD and Kalivas PW. 2011. Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* 63(2):348-65.

Step toe A, Kearsley N, Walters N. 1993. Cardiovascular activity during mental stress following vigorous exercise in sportsmen and inactive men. *Psychophysiology* 30(3):245-52.

Stewart J. 2000. Pathways to relapse: The neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J Psychiatry Neurosci* 25(2):125-36.

Stewart-Lee A and Burnstock G. 1989. Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: Substance P and [Glp6,L-Pro9]SP6-11 are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors. *Br J Pharmacol* 97(4):1218-24.

Stone DM, Hanson GR, Gibb JW. 1987. Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology* 26(11):1657-61.

Strakowski SM, Sax KW, Setters MJ, Keck PE, Jr. 1996. Enhanced response to repeated d-amphetamine challenge: Evidence for behavioral sensitization in humans. *Biol Psychiatry* 40(9):872-80.

Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog Neurobiol* 75(6):406-33.

Svingos AL, Periasamy S, Pickel VM. 2000. Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse* 36(3):222-32.

Takada M, Campbell KJ, Moriizumi T, Hattori T. 1990. On the origin of the dopaminergic innervation of the paraventricular thalamic nucleus. *Neurosci Lett* 115(1):33-6.

Tannenbaum B and Anisman H. 2003. Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. *Biol Psychiatry* 53(4):292-303.

Tata DA, Raudensky J, Yamamoto BK. 2007. Augmentation of methamphetamine-induced toxicity in the rat striatum by unpredictable stress: Contribution of enhanced hyperthermia. *Eur J Neurosci* 26(3):739-48.

Tatemoto K, Lundberg JM, Jornvall H, Mutt V. 1985. Neuropeptide K: Isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun* 128(2):947-53.

Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM, et al. 2010. Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 30(20):7105-10.

Teixeira-Gomes A, Costa VM, Feio-Azevedo R, Bastos Mde L, Carvalho F, Capela JP. 2015. The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *Int J Dev Neurosci* 41:44-62.

Tenovuo O, Rinne UK, Viljanen MK. 1984. Substance P immunoreactivity in the post-mortem parkinsonian brain. *Brain Res* 303(1):113-6.

Tenovuo O, Kolhinen O, Laihininen A, Rinne UK. 1990. Brain substance P receptors in parkinson's disease. *Adv Neurol* 53:145-8.

Tepper P and Woods JH. 1978. Changes in locomotor activity and naloxone-induced jumping in mice produced by WIN 35, 197-2 (ethylketazocine) and morphine. *Psychopharmacology (Berl)* 58(2):125-9.



- Thomas DM, Dowgiert J, Geddes TJ, Francescutti-Verbeem D, Liu X, Kuhn DM. 2004. Microglial activation is a pharmacologically specific marker for the neurotoxic amphetamines. *Neurosci Lett* 367(3):349-54.
- Thomsen M and Caine SB. 2011. Psychomotor stimulant effects of cocaine in rats and 15 mouse strains. *Exp Clin Psychopharmacol* 19(5):321-41.
- Trigo JM, Panayi F, Soria G, Maldonado R, Robledo P. 2006. A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naive mice. *Psychopharmacology (Berl)* 184(2):212-20.
- Tsao P, Cao T, von Zastrow M. 2001. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22(2):91-6.
- Tseng KY, Roubert C, Do L, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gershanik OS, Murer MG, Giros B, et al. 2000. Selective increase of Nurr1 mRNA expression in mesencephalic dopaminergic neurons of D2 dopamine receptor-deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res* 80(1):1-6.
- Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S. 1990. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur J Biochem* 193(3):751-7.
- Uhl GR. 2004a. Molecular genetics of substance abuse vulnerability: Remarkable recent convergence of genome scan results. *Ann N Y Acad Sci* 1025:1-13.
- Uhl GR. 2004b. Molecular genetic underpinnings of human substance abuse vulnerability: Likely contributions to understanding addiction as a mnemonic process. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:140-7.
- Ulrich-Lai YM, Xie W, Meij JT, Dolgas CM, Yu L, Herman JP. 2006. Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. *Physiol Behav* 88(1-2):67-76.
- Van Bockstaele EJ and Pickel VM. 1995. GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682(1-2):215-21.
- Van Bogaert M, Oosting R, Toth M, Groenink L, van Oorschot R, Olivier B. 2006. Effects of genetic background and null mutation of 5-HT1A receptors on basal and stress-induced body temperature: Modulation by serotonergic and GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 550(1-3):84-90.

van der Kam EL, Ellenbroek BA, Cools AR. 2005. Gene - environment interactions determine the individual variability in cocaine self-administration. *Neuropharmacology* 48(5):685-95.

van Giersbergen PL, Shatzer SA, Burcher E, Buck SH. 1992. Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide gamma with neurokinin A at NK2 receptors in the hamster urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345(1):51-6.

Vanderschuren LJ and Everitt BJ. 2004. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* 305(5686):1017-9.

Vanderschuren LJ, De Vries TJ, Wardeh G, Hogenboom FA, Schoffelmeer AN. 2001. A single exposure to morphine induces long-lasting behavioural and neurochemical sensitization in rats. *Eur J Neurosci* 14(9):1533-8.

Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelmeer AN. 1999. A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J Neurosci* 19(21):9579-86.

Vargas-Perez H, Ting-A Kee R, Walton CH, Hansen DM, Razavi R, Clarke L, Bufalino MR, Allison DW, Steffensen SC, van der Kooy D. 2009. Ventral tegmental area BDNF induces an opiate-dependent-like reward state in naive rats. *Science* 324(5935):1732-4.

Verkes RJ, Gijsman HJ, Pieters MS, Schoemaker RC, de Visser S, Kuijpers M, Pennings EJ, de Bruin D, Van de Wijngaart G, Van Gerven JM, et al. 2001. Cognitive performance and serotonergic function in users of ecstasy. *Psychopharmacology (Berl)* 153(2):196-202.

Vezeina P. 2004. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 27(8):827-39.

Vezeina P and Leyton M. 2009. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:160-8.

Vezeina P, Giovino AA, Wise RA, Stewart J. 1989. Environment-specific cross-sensitization between the locomotor activating effects of morphine and amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 32(2):581-4.

Vigas M. 1984. Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response. In: Stress. role of catecholamines and other neurotransmitters. Usdin ER e, editor. New York: Gordon and Breach Science Publications. 27 p.

Vinson GP, Hinson JP, Toth IE. 1994. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* 6(3):235-46.

Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22(15):6810-8.

Wagner FA and Anthony JC. 2002. Into the world of illegal drug use: Exposure opportunity and other mechanisms linking the use of alcohol, tobacco, marijuana, and cocaine. *Am J Epidemiol* 155(10):918-25.

Wallace TL, Gudelsky GA, Vorhees CV. 2001. Alterations in diurnal and nocturnal locomotor activity in rats treated with a monoamine-depleting regimen of methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 153(3):321-6.

Wang Z and Woolverton WL. 2007. Estimating the relative reinforcing strength of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its isomers in rhesus monkeys: Comparison to (+)-methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 189(4):483-8.

Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR. 1991. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5):1859-63.

Weir RK, Dudley JA, Yan TC, Grabowska EM, Pena-Oliver Y, Ripley TL, Stephens DN, Stanford SC, Hunt SP. 2014. The influence of test experience and NK1 receptor antagonists on the performance of NK1R<sup>-/-</sup> and wild type mice in the 5-choice serial reaction-time task. *J Psychopharmacol* 28(3):270-81.

Weiss F, Maldonado-Vlaar CS, Parsons LH, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O. 2000. Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: Effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8):4321-6.

White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ. 1996. The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 49(5):455-79.

Wiltshire T, Ervin RB, Duan H, Bogue MA, Zamboni WC, Cook S, Chung W, Zou F, Tarantino LM. 2015. Initial locomotor sensitivity to cocaine varies widely among inbred mouse strains. *Genes Brain Behav* 14(3):271-80.

Wise RA. 1996. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6(2):243-51.

Wise RA and Bozarth MA. 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94(4):469-92.

Wise RA and Bozarth MA. 1985. Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr Med* 3(4):445-60.

Wise RA and Bozarth MA. 1984. Brain reward circuitry: Four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain Res Bull* 12(2):203-8.

Wolf ME. 2010. Regulation of AMPA receptor trafficking in the nucleus accumbens by dopamine and cocaine. *Neurotox Res* 18(3-4):393-409.

Wolf ME. 1998. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54(6):679-720.

Wolf ME, Dahlin SL, Hu XT, Xue CJ, White K. 1995. Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: Comparison with N-methyl-D-aspartate antagonists. *Neuroscience* 69(2):417-39.

Wolffgramm J and Heyne A. 1995. From controlled drug intake to loss of control: The irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res* 70(1):77-94.

Yan TC, Hunt SP, Stanford SC. 2009. Behavioural and neurochemical abnormalities in mice lacking functional tachykinin-1 (NK1) receptors: A model of attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropharmacology* 57(7-8):627-35.

Yu J, Cadet JL, Angulo JA. 2002. Neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists abrogate methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity in the murine brain. *J Neurochem* 83(3):613-22.

Yu J, Wang J, Cadet JL, Angulo JA. 2004. Histological evidence supporting a role for the striatal neurokinin-1 receptor in methamphetamine-induced neurotoxicity in the mouse brain. *Brain Res* 1007(1-2):124-31.

Yu J, Allison S, Ibrahim D, Cadet JL, Angulo JA. 2002. Ontogeny of neurokinin-1 receptor mediation of methamphetamine neurotoxicity in the striatum of the mouse brain. *Ann N Y Acad Sci* 965:247-53.

Zarrindast MR and Rezayof A. 2004. Morphine state-dependent learning: Sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 497(2):197-204.

Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T, Olson L. 1996. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41(1-2):111-20.

Zhang C, Bonagamba LG, Machado BH. 2000. Blockade of NK-1 receptors in the lateral commissural nucleus tractus solitarii of awake rats had no effect on the cardiovascular responses to chemoreflex activation. *Braz J Med Biol Res* 33(11):1379-85.

Ziolkowska B, Korostynski M, Piechota M, Kubik J, Przewlocki R. 2012. Effects of morphine on immediate-early gene expression in the striatum of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacol Rep* 64(5):1091-104.





**ANEXO I**









## Adrenocortical and behavioural response to chronic restraint stress in neurokinin-1 receptor knockout mice

Raúl Delgado-Morales<sup>a,b,e,1,2</sup>, Eva del Río<sup>a,d,1</sup>, Almudena Gómez-Román<sup>a,b,e</sup>, Verónica Bisagno<sup>a,d</sup>, Roser Nadal<sup>a,c,e</sup>, Carmen de Felipe<sup>a,d</sup>, Antonio Armario<sup>a,b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Red de trastornos adictivos (RTA), Spain

<sup>b</sup> Animal Physiology Unit (School of Biosciences), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Psychobiology Unit (School of Psychology), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, 03550 San Juan de Alicante, Spain

<sup>e</sup> Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 March 2011

Received in revised form 5 October 2011

Accepted 7 October 2011

#### Keywords:

NK1<sup>-/-</sup> mice

Substance P

Chronic stress

Corticosterone

Adaptation

Spatial learning

Anxiety

### ABSTRACT

Brain substance P and its receptor (neurokinin-1, NK1) have a widespread brain distribution and are involved in an important number of behavioural and physiological responses to emotional stimuli. However, the role of NK1 receptors in the consequences of exposure to chronic stress has not been explored. The present study focused on the role of these receptors in the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) response to daily repeated restraint stress (evaluated by plasma corticosterone levels), as well as on the effect of this procedure on anxiety-like behaviour, spatial learning and memory in the Morris water maze (MWM), a hippocampus-dependent task. Adult null mutant NK1<sup>-/-</sup> mice, with a C57BL/6J background, and the corresponding wild-type mice showed similar resting corticosterone levels and, also, did not differ in corticosterone response to a first restraint. Nevertheless, adaptation to the repeated stressor was faster in NK1<sup>-/-</sup> mice. Chronic restraint modestly increased anxiety-like behaviour in the light–dark test, irrespective of genotype. Throughout the days of the MWM trials, NK1<sup>-/-</sup> mice showed a similar learning rate to that of wild-type mice, but had lower levels of thigmotaxis and showed a better retention in the probe trial. Chronic restraint stress did not affect these variables in either genotype. These results indicate that deletion of the NK1 receptor does not alter behavioural susceptibility to chronic repeated stress in mice, but accelerates adaptation of the HPA axis. In addition, deletion may result in lower levels of thigmotaxis and improved short-term spatial memory, perhaps reflecting a better learning strategy in the MWM.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Substance P (SP) was the first peptide characterized as a neurotransmitter/neuromodulator in peripheral nociceptive neurons, which synapse with dorsal spinal cord neurons [1]. It is now well established that SP terminals and cell bodies are present in numerous brain regions [2]. Substance P belongs to the family of neuropeptides called neurokinins, which includes SP, neurokinin A and neurokinin B. Neurokinins act through three cloned receptors NK1, NK2 and NK3, with SP having greater affinity for NK1 [3].

In recent decades, there has been a considerable increase in evidence showing that SP and NK receptors are involved in a wide

range of stress-related phenomena, including stress-induced analgesia, anxiety and depression-like behaviour [4]. Although most of these results have been obtained using selective non-peptide NK receptor antagonists, some have also been obtained using mice with functional deletions of the NK1 receptor or the *tac1* gene. Administration of SP or NK1 agonists induces anxiogenic effects, whereas blockade of NK1 receptors reduces anxiety [5–7] and has antidepressant properties [8,9]. Moreover, blockade of NK2 and NK3 receptors also appears to have antidepressant properties [9–11]. The above effects are quite consistent, even though there are some reports suggesting that SP can exert protective effects against stress, when administered into the dorsal hippocampus [12], which may suggest regional differences in the effect of SP.

Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis is the prototypical response to stress in all vertebrates, and is under the control of stimulatory inputs arriving at the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). It has been repeatedly found in rodents that plasma levels of peripheral HPA hormones (ACTH and corticosterone) reflect the intensity of a stressful situation [13].

\* Corresponding author at: Animal Physiology Unit (School of Biosciences), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 581 1840; fax: +34 93 581 2390.

<sup>1</sup> Both authors have contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address: Neuroadaptations Group, Max Planck Institute of Psychiatry, 80804 Munich, Germany.

Therefore, if SP were involved in the control of the emotional response to stress, it would be expected that this peptide had a role in the regulation of the HPA axis. In addition, SP fibres are present in the PVN, the key region in the regulation of the HPA axis, which contains corticotrophin-releasing hormone (CRH) and other putative secretagogues of ACTH that, in response to stressors, are released into the pituitary-portal blood. The role of SP and NK1 receptors, especially on the regulation of the HPA axis, is clearly inconsistent. For example, intracerebroventricular (icv) administration of SP has been found to both inhibit [14–16] and stimulate [17] the HPA axis. Similarly, central administration of non-peptide NK1 antagonists resulted in activation of the HPA axis [18], suggesting a predominantly inhibitory tone, whereas the simultaneous central administration of NK1 and NK2 antagonists reduced, in response to formalin stress, adrenaline, ACTH and PVN *c-fos* expression [19]. A reduction of *c-fos* expression induced by exposure to a novel environment has been observed in the PVN and other brain areas, by prior administration of NK1 antagonists [20]. It is important to take into consideration that a wide range of drugs are able to activate the HPA axis, regardless of their specific neurochemical actions [13]. Therefore, in the light of the controversial pharmacological findings, complementary approaches are needed.

Several mutant lines with deletion of the NK1 receptor have been generated in mice, which are interesting tools for studying the role of this receptor in stress-induced changes. However, to our knowledge, only a few previous reports have addressed the response to stress in NK1<sup>-/-</sup> mice. In a first report, maternal separation-induced ultrasound vocalisation in pups was found to be reduced in NK1<sup>-/-</sup> mice [21]. Other studies focused on corticosterone response to acute stress, with clearly conflicting results [22–24]. For instance, when compared to the corresponding wild-type mice, unaltered corticosterone response to stress was found in NK1<sup>-/-</sup> mice with a C57BL/6 background [23], whereas a reduced response was found in those with a 129/sv background [22]. However, McCutcheon et al. (2008) [24] compared in the same study NK1<sup>-/-</sup> mice with either pure C57BL/6 or mixed C57BL/6-129/sv backgrounds and their corresponding wild-type mice. They found differences in corticosterone response to stress between wild-type mice of both strains, but no influence of NK1 receptor deletion.

In addition to the paucity of data about the response to acute stressors in NK1<sup>-/-</sup> mice, to our knowledge, there is no published information about how genetic deletion of the NK1 receptor can affect endocrine and behavioural responses to chronic stress. It is possible that chronic exposure to stress may reveal effects of NK1 receptors, which are not observed under basal or acute stress conditions. Our hypothesis is that genetic deletion of the NK1 receptor would reduce the negative impact of chronic stress and would favour adaptation of the HPA axis. Hence, in the present work with NK1<sup>-/-</sup> mice, the effects of daily repeated exposure to restraint stress on the adaptation of the HPA axis were studied, as well as some behavioural aspects that have been found to be sensitive to stress, such as anxiety [25,26] and spatial memory [27,28].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and general procedures

Adult male NK1<sup>-/-</sup> mice and wild-type (NK1<sup>+/+</sup>) littermates were used. Original mice were derived from homologous recombination of C57BL/6j blastocysts implanted with 129/sv stem cells containing targeted disruption of the NK1 receptor gene [29]. Mice used in this study were obtained from the original C-57BL/6×129/sv line back-crossed onto a C57BL/6j background over 10 generations. They were named NK1<sup>-/-</sup> backcross and NK1<sup>+/+</sup> backcross.

The experimental procedures were always carried out in the morning between 8:30 a.m. and 1:00 p.m., when the resting and

stress levels of HPA hormones are very stable. All animals were handled for 4 days for approximately 2 min a day, before starting experiments. Animals were kept in groups of 4–5 under standard conditions of temperature (22 ± 1 °C) and a 12 h (8–20 h) dark/light cycle, with ad libitum food and water intake. The experimental protocols were approved by the Ethics Committees of the *Universidad Miguel Hernández de Elche* and of the *Universitat Autònoma de Barcelona*, following the “Principles of laboratory animal care”, and were carried out in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC).

### 2.2. Experiment 1

The aim of the experiment was to demonstrate possible differences in the response of the HPA axis to acute and repeated stress in NK1<sup>-/-</sup> mice. After the period of handling, blood samples were taken by the tail nick procedure, under resting conditions, to accustom animals to the procedure. The tail nick procedure consisted of gently wrapping the animals with a cloth, making a 2 mm incision at the end of the tail veins and then massaging the tail while collecting, within 2 min, 100 µl of blood into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). This procedure is extensively used in our laboratory [30,31] and results in levels of hormones similar to those obtained after decapitation without anaesthesia [32]. Wild-type and NK1<sup>-/-</sup> mice were assigned to control or chronic stress groups. In those mice assigned to control groups, blood samples were taken twice daily, with a 2 h interval between taking each sample. Those mice assigned to chronic stress groups were restrained daily for 2 h, with samples being taken just before and after restraint. Restraint procedure consisted in complete immobilization of the animal in open-ended Plexiglas cylindrical restrainers measuring 2.8 cm in diameter and 10 cm in length. The rear top of the apparatus was adapted in relation to the weight of the animal to maintain the same level of restraint, irrespective of animal size. Seven holes (1 cm in diameter) in the walls of the cylinder provided fresh air. The chronic stress protocol lasted for 9 days, sufficient time to verify the adaptation of the HPA axis [33,34]. Blood sampling was carried out on days 1, 4 and 9.

### 2.3. Experiment 2

The aim of the experiment was to demonstrate possible differences in the behavioural consequences of exposure to repeated restraint stress in NK1<sup>-/-</sup> mice. Wild-type and NK1<sup>-/-</sup> mice were assigned to control or chronic stress groups. Chronic stress consisted of daily exposure to 2 h restraint stress (previously described) for 14 days. A longer period of chronic stress than in the previous experiment was chosen to maximize possible effects. Two days after the last restraint session, control and chronically stressed mice were tested in the dark-light test, and 2 days later the Morris water maze protocol was started.

### 2.4. Corticosterone radioimmunoassay

Plasma corticosterone levels were determined by double-antibody radioimmunoassays (RIA) as previously reported [35]. In brief, the corticosterone RIA used 125I-corticosterone-carboxymethyl-oxime-tyrosine-methyl ester (ICN-Biolink 2000, Barcelona, Spain) as the tracer, synthetic corticosterone (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard, and an antibody raised in rabbits against corticosterone-carboxymethyl-oxime-BSA kindly provided by Dr. G. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary). We followed the RIA protocol recommended by Dr. G. Makara (plasma corticosteroid-binding globulin was inactivated by low pH). All samples to be statistically compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was 6% and the sensitivity 0.1 µg/dl.

## 2.5. Dark–light test

The dark–light test was performed 48 h after the last stress session. The dark–light box consisted of a small dark chamber (27 × 18 × 27 cm high) connected by a 7 × 7 cm opening to a larger white chamber (27 × 27 × 27 cm) without a top cover. The light intensity in the white compartment was 500 lx compared with 10 lx in the dark compartment. The mouse was placed in the dark compartment facing away from the light side. Behaviour of the mice was recorded for 10 min on video and analysed by a trained observer blind to the experimental conditions. The number of transitions from the dark to the light compartments, and the total time and activity in the light compartment were measured [36]. Entry into either side of the dark–light box was defined as the placement of all four paws into that side. The stretch-attend and flat-back postures were also measured as possible indices of anxiety [37].

## 2.6. Morris water maze

Mice were tested in the water maze for their spatial learning capabilities. A pool (white, diameter 120 cm) was filled with warm water (26 ± 1 °C), made opaque by the addition of non-toxic paint. A platform (10 cm in diameter) was situated 5 mm below the surface of the water (invisible condition) or 8 mm above the water level (dark coloured rim; visible condition). The pool was divided into four quadrants with the platform in the middle of one of the quadrants. The protocol established by Grootendorst et al. (2001) [38] was followed with some modifications. For each trial, the mouse was placed in the water at one of four locations, equally spaced along the sidewall of the pool. A maximum of 60 s was allowed, during which the mouse had to find the platform and climb onto it. It remained there for 20 s (day 1) or 10 s (remaining trials and days). If the animal did not find the platform, it was guided there with a grid and was allowed to stay for 20 s on the platform. Four animals were run sequentially for the same trial during one session. After each trial, mice were placed under a red-light warming lamp to dry. One day before spatial training in the water maze started, the pool was filled with 2 cm of warm water and a large flat object was added to aid climbing. This was the animal's first contact with water and each mouse was allowed to move around for 120 s (water adaptation trial). Water maze training on day 1 started with a 120 s free swim in absence of the platform. It was expected that this would motivate the animal to search for escape from the novel aversive environment and to consider the platform as a safe place when first encountered. It also allowed estimation of the ability of the mice to swim. A training trial with a visible platform followed 60 min later. Another trial, now with the invisible platform (trial 2) followed 60 min later. On days 2 and 3 the platform remained submerged and the interval between trials was about 5 min, except when otherwise stated. On day 2, seven training trials (trials 3 to 9) were run with a 120 min interval between trials 6 and 7. On day 3 four trials (trials 10 to 13) were run. For all training trials we assessed the latency (s) and travelled distance (cm) to find and climb on the platform, the swim speed (cm/s) and the time spent in the peripheral zone (thigmotaxis) as a possible measure of anxiety. Thigmotaxis was considered when the animal swam by the periphery of the pool, through a 13 cm corridor near the wall.

Five minutes after the last trial, a probe trial was carried out without the platform to evaluate short-term spatial memory. In the absence of the platform, if the animals remembered the usual location of the platform they would swim around the place where it used to be located [39]. Memory was then evaluated by measuring the distance travelled and the percentage of time spent in each quadrant: target (TQ), opposite (OQ), adjacent left (ALQ) and adjacent right (ARQ). Thigmotaxis and other parameters usually measured during regular trials were also recorded in the probe trial.

## 2.7. Statistical analysis

Experiment 1: to analyse the effects of repeated restraint stress on plasma corticosterone, generalized linear models (GzLM) were used [40], with repeated measurements (generalized estimating equations, GEE) [41], with stress and genotype as the between-subjects factors and day and sampling time as the within-subjects factors. Further comparisons were undertaken when appropriate.

Experiment 2: to analyse the influence of daily repeated restraint on behaviour in the dark–light test, a GzLM was used with stress and genotype as the between-subjects factors. To analyse the learning processes across days in the MWM, a GEE analysis was undertaken with the same between-subjects factors as above (stress and genotype), and days as the within-subjects factor. To analyse spatial memory in the probe trial a GEE was used, with stress and genotype as between-subjects factors and quadrant as the within-subjects factor. Data of thigmotaxis in the MWM were analysed by a GzLM, with stress and genotype as the between-subjects factors. If a statistically significant interaction was found, additional comparisons were made.

As a method of estimation, the maximum likelihood (ML) was used in all cases. The generalized linear model is a more flexible statistical tool than the standard general linear model (GLM), because several types of data distribution can be chosen. Normality distribution was chosen with identity as a link function, because it was a better fit for the data. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic.

## 3. Results

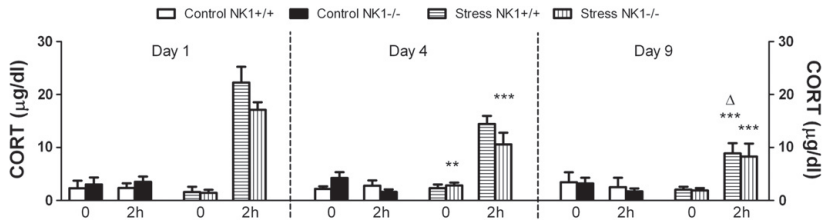
### 3.1. Experiment 1

Plasma corticosterone levels in control and repeatedly restrained mice are shown in Fig. 1. The GEE analysis revealed significant effects for stress (Wald  $\chi^2(1) = 41.21$ ,  $p < 0.001$ ), day (Wald  $\chi^2(2) = 20.84$ ,  $p < 0.001$ ), sampling time (Wald  $\chi^2(1) = 88.10$ ,  $p < 0.001$ ) and the interactions stress × day (Wald  $\chi^2(2) = 17.15$ ,  $p < 0.001$ ), stress × sampling time (Wald  $\chi^2(1) = 110.94$ ,  $p < 0.001$ ), genotype × day × sampling time (Wald  $\chi^2(2) = 11.44$ ,  $p < 0.005$ ) and stress × day × sampling time (Wald  $\chi^2(2) = 23.46$ ,  $p < 0.001$ ). Appropriate further comparisons revealed that no differences emerged regarding resting corticosterone levels, whereas an interaction genotype × day was found in response to stress: in wild-type mice the reduction of corticosterone response after repeated restraint did not reach statistical significance on day 4, but on day 9 the reduction was significant as compared to both day 1 ( $p < 0.001$ ) and day 4 ( $p < 0.05$ ); in contrast, in NK1<sup>-/-</sup> mice the reduction was already significant on day 4 and was maintained on day 9 ( $p < 0.001$  vs. day 1 in the two cases), with no additional reduction from day 4 to day 9.

### 3.2. Experiment 2

Statistical analysis of the number of entries in the white box (Fig. 2a) showed a significant effect of stress (Wald  $\chi^2(1) = 4.46$ ;  $p < 0.05$ ), but there was no significant effect of genotype or of the interaction stress × genotype. Animals exposed to restraint, regardless of genotype, showed a reduced number of entries into the white area. GzLM analysis of the time spent in the white box (Fig. 2b) did not reveal statistically significant effects of either stress or genotype. Activity and stretch-attend behaviour were also measured in the illuminated area. No differences between groups were observed regarding activity (not shown) and stretch-attend behaviour was very low in all animals and, therefore, was not quantified.

The GEE analysis of the spatial learning behaviour in the MWM (Fig. 3) revealed a significant effect of training day (Wald  $\chi^2(2) = 105.01$ ;  $p < 0.005$ ), but no significant effects were found for genotype or stress, or for the interactions stress × genotype and training

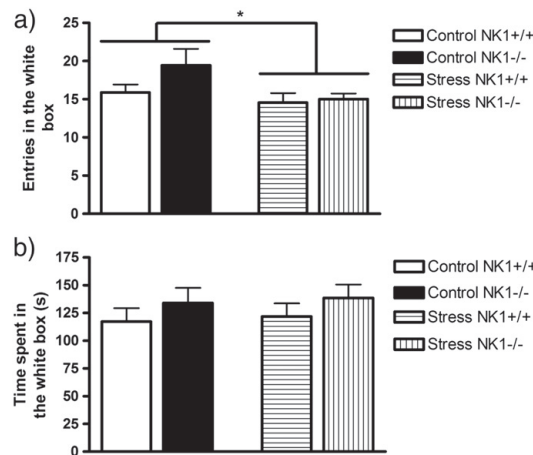


**Fig. 1.** Plasma corticosterone levels for stress-naïve (control) or chronic restraint NK1<sup>+/+</sup> and NK1<sup>-/-</sup> mice. Means and SEM ( $n=7-8$ /group) are represented. Samples were taken before the daily stressor (0) and immediately after stress (2 h) on days 1, 4 and 9 (or corresponding times for controls). \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  vs. the same genotype and sampling time on day 1;  $\Delta$   $p<0.05$  vs. the same genotype and sampling time on day 4.

day  $\times$  genotype. These results showed that mice of all groups learned to find the platform, with a similar pattern during the training days. A marginal effect was also found in the interaction stress  $\times$  training day (Wald  $\chi^2(2)=5.74$ ;  $p=0.056$ ), suggesting that animals of both genotypes exposed to restraint learnt to find the platform more avidly during the course of the training days than did the control mice.

The analysis of the time spent searching in each quadrant during the probe trial in the MWM (Fig. 4) showed a significant effect of quadrant (Wald  $\chi^2(3)=180.13$ ;  $p<0.001$ ). There were no significant effects for genotype or stress, and neither stress  $\times$  genotype nor stress  $\times$  quadrant was found to be significant interactions. However, the interaction quadrant  $\times$  genotype was significant (Wald  $\chi^2(3)=13.92$ ;  $p<0.005$ ). Decomposition of this interaction showed that knockout mice spent more time in the TQ and less time in the OQ than wild-type mice, regardless of stress; marginally significant differences were also found between genotypes in the ALQ quadrant, with NK1<sup>-/-</sup> spending less time in the ALQ quadrant than wild-type mice.

The GZLM analysis of thigmotaxis in the MWM (Fig. 5) showed a significant effect of genotype (Wald  $\chi^2(1)=4.41$ ;  $p<0.05$ ), but no significant effects were found for stress or the interaction stress  $\times$  genotype. These results suggest a higher preference for swimming in the peripheral area of the swimming pool during the probe trial in wild-type than in NK1<sup>-/-</sup> mice.



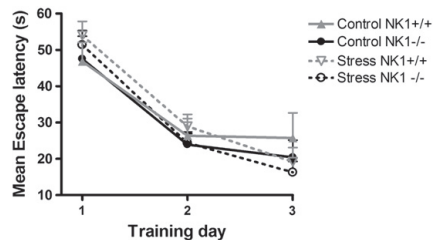
**Fig. 2.** Behaviour of NK1<sup>+/+</sup> and NK1<sup>-/-</sup> mice in the dark-light test after chronic restraint stress. Each bar shows mean  $\pm$  SEM ( $n=8-9$ /group) of the number of entries (a) and the time spent in the white box. The GZLM analysis revealed no effect of genotype or the interaction treatment by genotype, but a significant effect of chronic stress (\* $p<0.05$ ) in the number of entries. Any significant effect was found in the time spent in the white box.

#### 4. Discussion

The present results demonstrate that NK1<sup>-/-</sup> mice showed unaltered corticosterone response to acute restraint stress and faster adaptation to daily repeated exposure to the stressor than wild-type mice. In addition, repeated exposure to stress slightly increased anxiety-like behaviour in both genotypes, but did not affect spatial learning in the MWM. In the latter test, NK1<sup>-/-</sup> mice appeared to be more efficient than wild-type mice in that they showed lower levels of thigmotaxis and improved short-term memory.

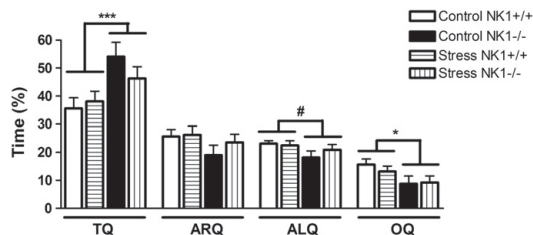
In the first experiment, resting activity of the HPA axis and its response to acute and chronic restraint stress were studied. Mutant mice showed plasma corticosterone levels similar to those of wild-type mice, suggesting no changes in resting HPA activity. The response to acute restraint was also similar in mutant and wild-type mice. When mice were exposed daily to restraint, both genotypes showed reduced corticosterone response after repeated exposure, although there were some differences between the two genotypes. In wild-type mice, reduced corticosterone response to restraint was only observed on day 9 as compared with day 1, whereas in NK1<sup>-/-</sup> mice reduction was already observed on day 4 and this level was maintained until day 9. Reduced corticosterone response to daily repeated restraint reflects partial adaptation of the HPA axis to this stressor, further confirming previous results in rats [42–45]. As the time-course of adaptation differed between the two genotypes, NK1 receptor activation may play some role in maintaining the response of the HPA axis, despite repeated experience with the same situation.

On the basis of previously available data, the role of NK1 receptors in HPA responsiveness to stressors is unclear. In NK1<sup>-/-</sup> mice, unaltered [23] or reduced [22] corticosterone response to stress has been reported, which could be at least in part explained by the genetic background (C57BL/6 in the former case, 129/sv in the latter) [22]. In this regard, McCutcheon et al. (2008) [24] compared in the same study NK1<sup>-/-</sup> mice with either pure C57BL/6 or mixed C57BL/6-129/sv backgrounds and their corresponding wild-type mice. Although they found differences in corticosterone response to stress



**Fig. 3.** Spatial learning behaviour of NK1<sup>+/+</sup> and NK1<sup>-/-</sup> mice in the MWM after chronic restraint stress. Means  $\pm$  SEM ( $n=8-10$ /group) of average escape latencies on each training day are represented. The GEE analysis revealed a significant effect of day ( $p<0.005$ ), but not of other factors or interactions.



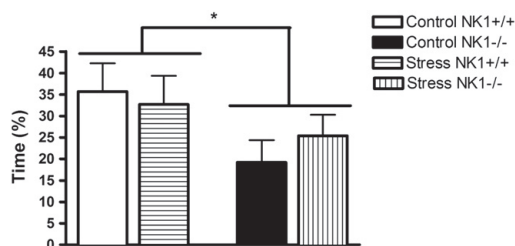


**Fig. 4.** Time spent searching in each quadrant of the MWM during the probe trial in NK1+/+ and NK1-/- mice after chronic restraint. Means  $\pm$  SEM ( $n=8-10$ /group) are represented. Quadrants are as follows: TQ, target quadrant; ARQ, adjacent right; ALQ, adjacent left; OQ, opposite. The GEE analysis revealed a significant interaction quadrant by genotype ( $p<0.005$ ). The decomposition of this interaction showed that NK1-/- spent more time in the TQ than NK1+/+ ( $***p=0.001$ ) and less in the OQ ( $*p=0.012$ ); a marginally significant effect of genotype was found in the ALQ ( $\#p=0.055$ ).

between wild-type mice of both strains, no influence of NK1 receptor deletion was observed. Our present results confirm that NK1 deletion in a C57BL/6 background does not alter corticosterone response to acute stress. It is thus possible that the effects of NK1 deletion on corticosterone response to stress are restricted to mice with a pure 129/sv background.

In the second experiment, the effect of 14 days of chronic restraint on anxiety-like behaviour and learning in the MWM was studied in mutant and wild-type mice. Anxiety-like behaviour was assessed in the dark-light test. Two days after the termination of the chronic stress protocol, chronically restrained mice showed a significantly reduced number of entries from the dark to the illuminated area, but no change in the time spent in the latter area. In the same test, few signs of other anxiety-related behaviours, such as stretch-attend and flat-back postures, were observed. The overall results suggest a modest anxiogenic effect of chronic restraint stress that was genotype-independent.

Our results show a lack of effect of the deletion of NK1 receptor on anxiety-like behaviour, in both stress-naïve and chronically stressed mice. Previous research has shown a reduction in anxiety-like behaviour, as evaluated in the elevated plus-maze (EPM) ([22]; 129/sv background) or an unaltered level of such behaviour ([46,47] mixed background) in NK1-/- mice. Indeed, when the latter mice were crossed to introduce the MF1 genetic background, NK1-/- mice showed hyperactivity in novel environments and some signs of reduced anxiety in the light-dark test [48,49], thereby suggesting a contribution of genetic background. Interestingly, diminished anxiety was found after deletion of the *tac1* gene, which encodes the neuropeptides substance P and neurokinin A, in a C57BL/6 background [50]. This suggests that



**Fig. 5.** Thigmotaxis behaviour in the MWM during the probe trial in NK1+/+ and NK1-/- mice after chronic restraint. Means  $\pm$  SEM ( $n=8-10$ /group) of the time spent in the peripheral zone in the MWM are represented. The GzLM analysis revealed a significant effect of genotype ( $*p<0.05$ ), with NK1-/- mice spending less time in the peripheral zone than NK1+/+ mice, regardless of the stress condition.

lack of both SP and NKA exerts stronger effects on anxiety than a lack of NK1 receptors.

In the literature, controversial effects of chronic exposure to restraint stress on anxiety-like behaviour have been reported, using EPM measurements and other tests [25,51]. Although some of these controversies may be related to the particular stress protocol and the use of animals differing in susceptibility to stress, it is still difficult to precisely determine the origin of such conflicting findings. The varied susceptibility of different animals has been directly tested in various studies. For example, long-lasting exposure to chronic stress enhanced anxiety and depression-like behaviour in BALB/cByJ, but not in C57BL/6ByJ mice [52]. In another study, C57BL/6 mice were again more resistant than BALB/cj and DBA/2j to chronic unpredictable stress-induced increases in anxiety-like behaviour in the light-dark test [53]. Yet, there is also some evidence in rats and mice that chronic unpredictable stress can reduce rather than enhance anxiety [54,55]. Therefore, special attention should be paid to the factors determining susceptibility versus resilience to stressors.

A few days after finishing the chronic stress protocol, mice started training in the MWM to evaluate spatial memory, a hippocampus dependent task. No effects of chronic restraint stress were observed, whereas genotype differences in some parameters were noted. For example, during the probe trial (platform removed) mutant mice showed improved short-term (5 min) retention of the task in comparison to wild-type mice, as reflected by the greater time spent in the quadrant where the platform was located during learning. Both genotypes appeared to learn, in a similar way, how to find the hidden platform, as judged by the latency in finding the platform throughout the days of the experimental protocol. However, NK1-/- mice showed reduced thigmotaxis, suggesting an improved learning strategy. As no evidence for altered anxiety was observed in mutant mice in the dark-light test, it is unlikely that reduced thigmotaxis was related to a reduced anxiety. In fact, the anxiolytic diazepam did not alter the enhanced thigmotaxis observed in mice over-expressing the alpha-2C receptors [56], suggesting an altered strategy not linked to changes in anxiety. In addition to changes in thigmotaxis, the improved retention performance observed in NK1R-/- mice is compatible with their increased neurogenesis in the dentate gyrus and their higher levels of hippocampal BDNF [57]. Both neurogenesis and BDNF expression have been repeatedly found to be positively associated to hippocampus-dependent tasks [58,59], even though in a previous study improved performance in the MWM or in trace fear conditioning (two tasks assumed to be hippocampus-dependent) was not observed [57].

Under the conditions present in our study, chronic restraint stress did not appear to impair spatial learning in any genotype; thereby ruling out that the lack of NK1 receptors could sensitize the mice to the effects of stress. The lack of an effect by chronic restraint stress merits further comment. In a recent review on the topic [60], there is an excellent discussion of the factors putatively involved in the discrepancies between experiments. In addition to the use of different spatial learning tasks and outcomes, the length and type of chronic stress protocols appear to be important. For example, in rats exposed to chronic restraint stress, more than 2 weeks of exposure appears to be needed to induce some deficits [27,61], which may be compatible with our results. Another critical factor is the particular strain used, as marked strain differences have been repeatedly reported regarding the impact of stress in both rats and mice. More precisely, C57BL/6 mice have been found to be resistant to the consequences of exposure to chronic unpredictable stress in terms of impaired passive avoidance [62]. Pothion et al. (2004) [63] reported no effect of chronic unpredictable stress on spatial learning in the MWM in 3 different mice strains (CBA/H, DBA/2j) and C57BL/6j, whereas impaired long-term memory was observed only in the former. It is possible that radial maze tasks are more sensitive than the MWM, because chronic acoustic stress impaired radial maze learning in the C57BL/6 strain, but improved it in the DBA/2j [64].

In conclusion, the present results indicate that mice exposed to daily restraint stress showed evidence of the adaptation of the HPA axis, a modest increase in anxiety and no altered learning or memory in the MWM. Null mutation of the NK1 receptor resulted in unaltered corticosterone response to acute restraint stress, but faster adaptation to repeated restraint. Genotype differences were not found in the behavioural consequences of stress, although NK1<sup>-/-</sup> mice showed some evidence of improved short-term spatial memory. The previously reported enhancement of dentate gyrus neurogenesis in NK1<sup>-/-</sup> mice and their depression-resistant phenotype deserve further attention, regarding the putative role of NK1 receptors in depression [57]. The present results favour the hypothesis that the deletion of NK1 receptors does not have negative consequences when animals are exposed to chronic stress, thereby suggesting that there will be no negative consequences when NK1 antagonists are used in therapy against stress-related pathologies.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (SAF2008-01175), the *Instituto de Salud Carlos III* (RD06/0001/0015 and RD06/0001/0007, *Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo*), the *Plan Nacional sobre Drogas* and the *Generalitat de Catalunya* (SGR2009-16).

### References

- Otsuka M, Konishi S. Substance P – the first peptide neurotransmitter? *Trends Neurosci* 1983;6:317–20.
- Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN, O'Donohue TL. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* 1984;5:1097–128.
- Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 1995;26:911–44.
- Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* 2006;31:251–72.
- File SE. Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:747–52.
- Bassi GS, Nobre MJ, Carvalho MC, Brandao ML. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. *Behav Brain Res* 2007;182:301–7.
- Bassi GS, Nobre MJ, de Araujo JE, Brandao ML. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. *Neuropeptides* 2007;41:365–74.
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 1998;281:1640–5.
- Dableh IJ, Yashpal K, Rochford J, Henry JL. Antidepressant-like effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. *Eur J Pharmacol* 2005;507:99–105.
- Steinberg R, Alonso R, Griebel G, Bert L, Jung M, Oury-Donat F, et al. Selective blockade of neurokinin-2 receptors produces antidepressant-like effects associated with reduced corticotropin-releasing factor function. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:449–58.
- Panocka I, Massi M, Lapo I, Swiderski T, Kowalczyk M, Sadowski B. Antidepressant-type effect of the NK3 tachykinin receptor agonist aminoketide in mouse lines differing in endogenous opioid system activity. *Peptides* 2001;22:1037–42.
- Carvalho MC, Masson S, Brandao ML, de Souza Silva MA. Anxiolytic-like effects of substance P administration into the dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. *Peptides* 2008;29:1191–200.
- Armario A. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:485–501.
- Chowdrey HS, Jessop DS, Lightman SL. Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat. *Neuroendocrinology* 1990;52:90–3.
- Larsen PJ, Jessop D, Patel H, Lightman SL, Chowdrey HS. Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotropin via a central mechanism involving corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 1993;5:99–105.
- Saphier D, Welch JE, Farrar GE, Nguyen NQ, Aguado F, Thaller TR, et al. Interactions between serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and substance P in the CNS regulation of adrenocortical secretion. *Psychoneuroendocrinology* 1994;19:779–97.
- Mello DM, Marcinihen DR, Madruga D, Branco R, Paschoalini MA, De Lima TC. Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P. *Behav Brain Res* 2007;181:232–8.
- Jessop DS, Renshaw D, Larsen PJ, Chowdrey HS, Harbuz MS. Substance P is involved in terminating the hypothalamo–pituitary–adrenal axis response to acute stress through centrally located neurokinin-1 receptors. *Stress* 2000;3:209–20.
- Culman J, Das G, Ohlendorf C, Haass M, Maser-Gluth C, Zuhayra M, et al. Blockade of tachykinin NK1/NK2 receptors in the brain attenuates the activation of the corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and the sympathoadrenal and pituitary–adrenal responses to formalin-induced pain in the rat. *J Neuroendocrinol* 2010;22:467–76.
- Ebner K, Muigg P, Singewald G, Singewald N. Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1144:61–73.
- Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, et al. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology* 2000;39:1413–21.
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, et al. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1912–7.
- Kandere-Grzybowska K, Gheorghe D, Priller J, Esposito P, Huang M, Gerard N, et al. Stress-induced dura vascular permeability does not develop in mast cell-deficient and neurokinin-1 receptor knockout mice. *Brain Res* 2003;980:213–20.
- McCutcheon JE, Fisher AS, Guzdar E, Wood SA, Lightman SL, Hunt SP. Genetic background influences the behavioural and molecular consequences of neurokinin-1 receptor knockout. *Eur J Neurosci* 2008;27:683–90.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 2002;22:6810–8.
- Bhatnagar S, Vining C. Facilitation of hypothalamic–pituitary–adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm Behav* 2003;43:158–65.
- Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 1994;639:167–70.
- Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* 1996;110:1321–34.
- De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, et al. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 1998;392:394–7.
- García A, Martí O, Valles A, Dal-Zotto S, Armario A. Recovery of the hypothalamic–pituitary–adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 2000;72:114–25.
- Gagliano H, Fuentes S, Nadal R, Armario A. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary–adrenal responses. *Behav Brain Res* 2008;187:239–45.
- Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E823–8.
- Marquez C, Nadal R, Armario A. The hypothalamic–pituitary–adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 2004;123:601–12.
- Weinberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, Campeau S, et al. Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinology* 2009;150:749–61.
- Marquez C, Nadal R, Armario A. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic–pituitary–adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behav Brain Res* 2006;168:13–22.
- Hascot M, Bourin M, Nic Dhonnchadha BA. The mouse light–dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:141–66.
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Tom P, Rodgers RJ. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology* 1990;101:511–8.
- Grootendorst J, de Kloet ER, Dalm S, Oitzl MS. Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience* 2001;108:237–47.
- Spooner RIV, Thomson A, Hall J, Morris RGM, Salter SH. The atlantis platform: a new design and further developments of Buresova's on-demand platform for the water maze. *Learn Mem* 1994;1:203–11.
- McCulloch CE, Searle SR. *Generalized, linear, and mixed models*. New York: John Wiley & Sons; 2001.
- Hardin JW, Hilbe J. *Generalized estimating equations*. Boca Raton, Fla: Chapman & Hall/CRC; 2003.
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 1988;43:41–6.
- Hauger RL, Lorang M, Irwin M, Aguilera G. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res* 1990;532:34–40.
- Chen X, Herbert J. The effect of long-term castration on the neuronal and physiological responses to acute or repeated restraint stress: interactions with opioids and prostaglandins. *J Neuroendocrinol* 1995;7:137–44.
- Ma XM, Lightman SL. The arginine vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol* 1998;510(Pt 2):605–14.

- [46] Murtra P, Sheasby AM, Hunt SP, De Felipe C. Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 2000;405:180–3.
- [47] Rupniak NM, Carlson EJ, Webb JK, Harrison T, Porsolt RD, Roux S, et al. Comparison of the phenotype of NK1R<sup>-/-</sup> mice with pharmacological blockade of the substance P (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. *Behav Pharmacol* 2001;12:497–508.
- [48] Herpfer I, Hunt SP, Standord SC. A comparison of neurokinin 1 receptor knock-out (NK1<sup>-/-</sup>) and wildtype mice: exploratory behaviour and extracellular noradrenaline concentration in the cerebral cortex of anaesthetised subjects. *Neuropharmacology* 2005;48:706–19.
- [49] Fisher AS, Stewart RJ, Yan T, Hunt SP, Stanford SC. Disruption of noradrenergic transmission and the behavioural response to a novel environment in NK1R<sup>-/-</sup> mice. *Eur J Neurosci* 2007;25:1195–204.
- [50] Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Zimmer A. Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. *J Neurosci* 2002;22:10046–52.
- [51] Cancela LM, Bregonzio C, Molina VA. Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment. *Brain Res Bull* 1995;36:209–13.
- [52] Tannenbaum B, Anisman H. Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. *Biol Psychiatry* 2003;53:292–303.
- [53] Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 2006;175:43–50.
- [54] D'Aquila PS, Brain P, Willner P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav* 1994;56:861–7.
- [55] Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One* 2009;4:e4326.
- [56] Bjorklund M, Sirvio J, Sallinen J, Scheinin M, Kobilka BK, Riekkinen Jr P. Alpha2C-adrenoceptor overexpression disrupts execution of spatial and non-spatial search patterns. *Neuroscience* 1999;88:1187–98.
- [57] Morcuende S, Gadd CA, Peters M, Moss A, Harris EA, Sheasby A, et al. Increased neurogenesis and brain-derived neurotrophic factor in neurokinin-1 receptor gene knockout mice. *Eur J Neurosci* 2003;18:1828–36.
- [58] Bekinschtein P, Cammarota M, Katze C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2711–6.
- [59] Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010;11:339–50.
- [60] Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:742–55.
- [61] Luine V, Martinez C, Villegas M, Magarinos AM, McEwen BS. Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol Behav* 1996;59:27–32.
- [62] Palumbo ML, Zorrilla Zubieta MA, Cremaschi GA, Genaro AM. Different effect of chronic stress on learning and memory in BALB/c and C57BL/6 inbred mice: involvement of hippocampal NO production and PKC activity. *Stress* 2009;12:350–61.
- [63] Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 2004;155:135–46.
- [64] Ambrosini MV, Mariucci G, Tantucci M, Van Hooijdonk L, Ammassari-Teule M. Hippocampal 72-kDa heat shock protein expression varies according to mice learning performance independently from chronic exposure to stress. *Hippocampus* 2005;15:413–7.



