

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**  
**Departamento de Psicobiología**



**ADICCIÓN A LA COCAÍNA: ESTUDIO GENÓMICO DE  
MODULADORES DE LA TRANSMISIÓN  
GLUTAMATÉRGICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Ana Palomino Barrigas**

Bajo la dirección de los doctores  
Fernando Rodríguez de Fonseca y Francisco Javier Bermúdez Silva

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-0108-4**

# **Adicción a Cocaína: Estudio Genómico de Moduladores de la Transmisión Glutamatérgica.**

**ANA PALOMINO BARRIGAS**

**Directores:**

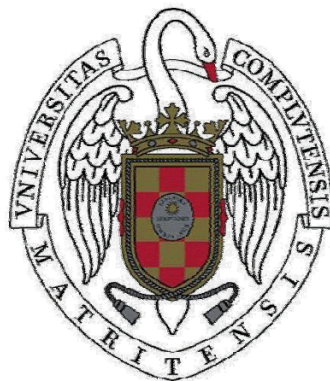
**Fernando Rodríguez de Fonseca**

**Francisco Javier Bermúdez Silva**

**Instituto Mediterráneo para el Avance de la Biotecnología y la Investigación Sanitaria**



**Programa de doctorado en Neurociencias de la Universidad Complutense de Madrid.**





**ÍNDICE**

---



## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos de la cocaína.....	1
2. Farmacología de la cocaína.....	2
a. Química.....	2
b. Absorción y distribución.....	2
3. Fenómenos de adicción inducidos por cocaína.....	3
4. Sistema de recompensa y cocaína.....	6
5. Papel del sistema dopaminérgico en las acciones de la cocaína.....	11
6. Papel del sistema glutamatérgico en las acciones de la cocaína.....	15
7. Papel del sistema cannabinoide en las acciones de la cocaína.....	20
8. Papel del receptor PPAR $\alpha$ en las acciones de la cocaína.....	27
9. Ácido lisofosfatídico: un nuevo neuromodulador. Papel en las acciones de la cocaína.....	29
<b>2. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>I. Animales.....</b>	<b>42</b>
<b>II. Drogas.....</b>	<b>42</b>
<b>III. Estudios de comportamiento.....</b>	<b>43</b>
1. Test del campo abierto.....	43
2. Protocolo curva dosis-respuesta.....	44
3. Protocolo de sensibilización.....	44
<b>IV. Análisis de la expresión génica.....</b>	<b>46</b>
1. Extracción del ARN total.....	47
2. Purificación.....	48
3. Cuantificación.....	48
4. Transcripción reversa.....	49
5. PCR cuantitativa a tiempo real.....	50



<b>V.</b>	<b>Inmunodetección (<i>western blotting</i>)</b> .....	56
1.	Preparación de membranas.....	56
2.	Cuantificación de proteínas totales.....	57
3.	Inmunodetección.....	58
<b>VI.</b>	<b>Inmunohistoquímica</b> .....	60
<b>VII.</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
<b>I.</b>	<b>Acciones de la cocaína en ratones B16C57</b> .....	62
1.	Resultados comportamentales.....	62
1.1.	Curva dosis-respuesta a cocaína.....	62
1.2.	Condicionamiento con cocaína.....	63
1.3.	Locomoción condicionada inducida por cocaína.....	64
1.4.	Sensibilización locomotora inducida por cocaína.....	64
2.	Resultados de genómica.....	66
2.1.	Sistema dopaminérgico.....	66
2.1.1.	<u>Estriado</u> .....	67
2.1.1.1.	Receptor	
2.1.1.2.	Síntesis	
2.1.1.3.	Transportador	
2.1.2.	<u>Hipocampo</u> .....	70
2.1.2.1.	Receptor	
2.1.2.2.	Síntesis	
2.1.2.3.	Transportador	
2.1.3.	<u>Corteza prefrontal</u> .....	72
2.1.3.1.	Receptor	
2.1.3.2.	Síntesis	
2.1.3.3.	Transportador	
2.1.4.	<u>Cerebelo</u> .....	74
2.1.4.1.	Receptor	
2.1.4.2.	Síntesis	
2.1.4.3.	Transportador	
2.2.	Sistema cannabinoide.....	76
2.2.1.	<u>Estriado</u> .....	77
2.2.1.1.	Receptor	



---

2.2.1.2.Síntesis	
2.2.1.3.Degradación	
2.2.2. <u>Hipocampo</u> .....	83
2.2.2.1.Receptor	
2.2.2.2.Síntesis	
2.2.2.3.Degradación	
2.2.3. <u>Corteza prefrontal</u> .....	87
2.2.3.1.Receptor	
2.2.3.2.Síntesis	
2.2.3.3.Degradación	
2.2.4. <u>Cerebelo</u> .....	92
2.2.4.1.Receptor	
2.2.4.2.Síntesis	
2.2.4.3.Degradación	
2.3. Sistema glutamatérgico.....	97
2.3.1. <u>Estriado</u> .....	97
2.3.1.1.Síntesis	
2.3.1.2.Receptor NMDA	
2.3.1.3.Receptor AMPA	
2.3.1.4.Receptor mGluR5	
2.3.1.5.Transportador	
2.3.2. <u>Hipocampo</u> .....	103
2.3.2.1.Síntesis	
2.3.2.2.Receptor NMDA	
2.3.2.3.Receptor AMPA	
2.3.2.4.Receptor mGluR5	
2.3.2.5.Transportador	
2.3.3. <u>Corteza prefrontal</u> .....	107
2.3.3.1.Síntesis	
2.3.3.2.Receptor NMDA	
2.3.3.3.Receptor AMPA	
2.3.3.4.Receptor mGluR5	
2.3.3.5.Transportador	
2.3.4. <u>Cerebelo</u> .....	111
2.3.4.1.Síntesis	
2.3.4.2.Receptor NMDA	
2.3.4.3.Receptor AMPA	
2.3.4.4.Receptor mGluR5	
2.3.4.5.Transportador	

---



---

<b>II. Acciones de la cocaína en ratones deficientes del receptor PPAR<math>\alpha</math></b> .....	115
1. Inmunohistoquímica.....	115
2. Resultados comportamentales.....	117
2.1. Condicionamiento inducido por cocaína .....	117
2.2. Locomoción condicionada inducida por cocaína.....	117
2.3. Sensibilización locomotora inducida por cocaína.....	118
2.4. Efecto de la OEA sobre el efecto agudo de la cocaína.....	119
2.5. Efecto de la OEA sobre el condicionamiento locomotor inducido por cocaína.....	120
2.6. Efecto de la OEA sobre la locomoción condicionada inducida por cocaína.....	120
2.7. Efecto de la OEA sobre la sensibilización locomotora inducida por cocaína.....	121
<b>III. Acciones de la cocaína en ratones deficientes del receptor LPA1</b> .....	122
1. Resultados comportamentales.....	122
1.1. Curva dosis-respuesta a cocaína.....	122
1.2. Condicionamiento inducido por cocaína .....	123
1.3. Locomoción condicionada inducida por cocaína.....	123
1.4. Sensibilización locomotora inducida por cocaína.....	124
2. Resultados de genómica.....	125
2.1. Sistema dopaminérgico.....	126
2.1.1. Síntesis	
2.1.2. Receptor	
2.1.3. Transportador	
2.2. Sistema cannabinoide.....	128
2.2.1. <u>Estriado</u> .....	128
2.2.1.1.Receptor	
2.2.1.2.Síntesis	
2.2.1.3.Degradación	
2.2.2. <u>Hipocampo</u> .....	130
2.2.2.1.Receptor	
2.2.2.2.Síntesis	
2.2.2.3.Degradación	
2.2.3. <u>Corteza prefrontal</u> .....	133
2.2.3.1.Receptor	

---



---

2.2.3.2.Síntesis	
2.2.3.3.Degradación	
2.2.4. <u>Cerebelo</u> .....	134
2.2.4.1.Receptor	
2.2.4.2.Síntesis	
2.2.4.3.Degradación	
<b>3. DISCUSIÓN</b> .....	138
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	143

---



**IMABIS**

**INTRODUCCIÓN**

---



## 1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA COCAÍNA.

La cocaína es un alcaloide natural que incrementa la concentración de dopamina en los centros de recompensa cerebrales; como estimulante neuropsicológico que es, la cocaína reduce la somnolencia, incrementa el estado de alerta y proporciona concentración.

Erythroxylon coca es la planta de la que se extrae la cocaína (benzoilmetilecgonina  $C_{17}H_{21}NO_4$ ), nativa de los Andes y del este de Sudamérica (Karch y cols., 1999). Se ha utilizado por los indios andinos durante cientos de años, los cuales masticaban las hojas de coca para disminuir los síntomas asociados a la vida en altas altitudes (vértigo y náuseas). Mediante la masticación, los niveles de cocaína en sangre son muy bajos, de manera que incluso después de años de uso es raro encontrar restos de cocaína en estos indios; de este modo por tanto, la toxicidad de este psicoestimulante es muy baja (Holmstedt y cols., 1979).

También se ha utilizado en medicina como agente anestésico local vasoconstrictor, lo cual es beneficioso en la cirugía de nariz, oreja y garganta. La dosis máxima de seguridad permitida es de 3 mg/kg. Pero su uso declinó debido al marcado incremento de investigaciones que relacionaban la cocaína con mortalidad y toxicidad. A su vez se fue reduciendo su uso por el desarrollo de otros anestésicos locales sin efectos simpaticomiméticos (Sora y cols., 2001).

La adicción a psicoestimulantes representa hoy día un desafío de primera magnitud para los sistemas de salud. Los últimos datos epidemiológicos indican que, lejos de estabilizarse, su uso sigue extendiéndose cada vez más. La contribución genómica a la adicción a cocaína se desconoce en gran medida, por lo que el desarrollo de terapias destinadas a disminuir el impacto de estas drogas no ha dado apenas fruto.



## 2. FARMACOLOGÍA DE LA COCAÍNA

### a. Química

La forma más común de esta droga es el clorhidrato de cocaína (89% de cocaína por peso); se produce al disolverla en ácido clorhídrico. Esta sal es soluble en agua y la deshidratación produce cristales blancos o un polvo, que es la presentación más común. El clorhidrato de cocaína es ligeramente amargo y adormece la mucosa oral. Normalmente se administra por la nariz, aunque también se puede usar por la vía intravenosa, oral o rectal.

La base libre, el alcaloide natural, es insoluble en agua, incolora e insípida. Se evapora alrededor de los 100 grados, pero es químicamente estable. Se extrae del clorhidrato de cocaína por disolución en una solución alcalina, seguido por la adición de un solvente como el éter, la mezcla se separa en dos capas, la superior contiene la cocaína, que se puede extraer por evaporación del solvente. La cocaína base precipita y se endurece al secarse produciendo una piedra, la cual es rota en cristales. Al calentarse, el cristal produce un sonido de pompas, es la forma pura y debido a ese sonido se denomina crack. Si se fuma produce una subida más rápida y más intensa que el clorhidrato de cocaína (con un tiempo de circulación entre pulmón-cerebro de 6-8 segundos), pero la euforia es corta (menor de 15 minutos), mientras que el clorhidrato administrado por vía nasal produce una euforia de alrededor de 60 minutos (Warner y cols., 1993). El crack parece ser más adictivo y la incidencia de su abuso está incrementando (Jekel y cols., 1986).

### b. Absorción y distribución

Después de la administración, la cocaína es rápidamente redistribuida desde el plasma, encontrándose a altas concentraciones en los compartimentos ricos en vasos



sanguíneos, como el cerebro. El 5% de la cocaína es excretada por la orina sin metabolizar. El 8% es metabolizada por el plasma y por las esterasas del hígado para producir esteroides de metil ecgonina y benzoilecgonina (Warner y cols., 1993) y son detectadas en la orina a partir del día 14 después del consumo (Fleming y cols., 1990). La pseudocolinesterasa plasmática muestra un polimorfismo genético (Hoffman y cols., 1992), y una pequeña porción de la población esterifica lentamente, lo que da como resultado una euforia prolongada e incrementa la incidencia de la patología asociada con la cocaína (Hoffman y cols., 1992). Igualmente, la actividad de la colinesterasa plasmática es reducida en niños, durante el embarazo y la vejez (Ambre y cols., 1982).

### **3. FENÓMENOS DE ADICCIÓN INDUCIDOS POR COCAÍNA.**

La adicción a drogas es un desorden crónico caracterizado por un consumo compulsivo de una o más drogas de abuso, la incapacidad para controlar dicho consumo, que terminará por ser continuado, aún las consecuencias negativas que esto conlleva (Deroche-Gamonet y cols., 2004)

La adicción incluye complejos procesos comportamentales y neurobiológicos. Todas las drogas de abuso producen efectos de refuerzo responsables de la iniciación del desorden adictivo (Maldonado y cols., 2006). Aunque los determinantes neurobiológicos que contribuyen al comportamiento adictivo siguen siendo desconocidos, se cree que las drogas de abuso usurpan el circuito de recompensa natural que responde a refuerzos como el alimento (Carr y cols., 2002), sexo (Pfaus y cols., 1995) y las interacciones sociales positivas (Insel y cols., 2003). Sin embargo, otros procesos comportamentales son también cruciales para el mantenimiento de la adicción, incluyendo las consecuencias negativas de la abstinencia y los diferentes estímulos que



conducen a la recaída, como por ejemplo las señales asociadas a la droga, eventos estresantes y la re-exposición a la droga (Koob y cols., 2004; Nestler y cols., 2004).

En concreto, el consumo crónico de estimulantes psicomotores es bien conocido por alterar la expresión génica neuronal (Nestler y cols., 2001). Específicamente, se ha demostrado que la administración de cocaína afecta a la expresión de un amplio número de genes en diferentes regiones cerebrales. Estos genes codifican una gran variedad de funciones moleculares, desde factores de transcripción, receptores de neurotransmisores y transportadores, y mecanismos de transducción de señales. Algunos de estos cambios en la expresión génica son la base de los efectos comportamentales de la cocaína (Kelz y cols., 1999).

Se observan dos tipos de respuestas cerebrales diferentes a las drogas adictivas:

- adaptaciones neuronales, las cuales son principalmente respuestas homeostáticas a una estimulación excesiva
- plasticidad sináptica, la cual conduce a la asociación de estímulos relacionados con la droga y comportamientos de aprendizaje específicos (Berke and Hyman y cols., 2000).

Si la cocaína se usa repetidamente, algunos efectos de las drogas pueden disminuir (“tolerancia”), mientras que otros son potenciales (“sensibilización”). El que ocurra uno u otro efecto depende, en parte, del patrón de administración de la droga. De hecho, los animales que reciben varias inyecciones de droga espaciadas en intervalos de tiempo de días o más, tienden a mostrar una actividad locomotora sensibilizada y estereotipias, que aumentan progresivamente con cada inyección. Los animales que recibieron la droga continuamente a través de una bomba osmótica, o por inyecciones muy cercanas en el tiempo, muestran una respuesta locomotora disminuida cuando se les re-expone a la droga (Kuribara y cols., 1996).



Además, los cambios neuronales responsables de la tolerancia y la sensibilización pueden coexistir. En los experimentos de Dalia y cols., (1998) las ratas recibieron inyecciones intermitentes de cocaína (40 mg/kg, con un intervalo de tres días entre inyecciones) y mostraron una respuesta sensibilizada a una dosis de cocaína de 7.5 mg/kg. Después, a los mismos animales se les implantó una bomba osmótica que liberaba cocaína continuamente (80 mg/kg/día) durante siete días. Un día después de la retirada de la bomba, los animales mostraron tolerancia a una dosis de 7.5 mg/kg. Sin embargo, a los 10 días de la retirada de la bomba, las ratas mostraron una respuesta sensibilizada a la misma dosis de cocaína. Así pues, los mecanismos neuronales de la tolerancia pueden enmascarar la expresión de la sensibilización durante algún tiempo (Kalivas and Duffy, 1993); pero la actividad locomotora sensibilizada puede persistir durante años (Paulson y cols., 1991).

La sensibilización se presenta en dos estadios, denominados inducción y expresión (Brenhouse y cols., 2006). La inducción de la sensibilización está definida como la secuencia transitoria de eventos moleculares y celulares activados por la administración de psicoestimulantes que llevan a fijar los cambios en la función neuronal. La expresión es la manifestación de las alteraciones celulares a largo plazo que surgen de la fase de inducción y directamente mediante la respuesta comportamental aumentada (Pierce y cols., 1997). La inducción parece ocurrir durante la administración repetida de la droga y posiblemente dura uno o dos días después de que la administración haya cesado, mientras que los cambios que son vistos semanas después del cese del tratamiento están asociados con la expresión.

La sensibilización puede ser operacionalmente definida como un desplazamiento a la izquierda en la curva dosis-respuesta (Altman y cols., 1996). Mecanísticamente, esto podría dar lugar, al menos, a dos vías diferentes:



1. La droga podría tener un efecto farmacológico incrementado, por ejemplo, resultado del incremento del número de receptores de la droga o fortaleciendo su acoplamiento a las proteínas efectoras.
2. Alternativamente, un incremento del efecto comportamental podría resultar de la acción de la droga sobre circuitos neuronales, en los cuales hay patrones alterados de la información almacenada, resultante de un aprendizaje asociativo previo (Berke and Hyman, 2000).

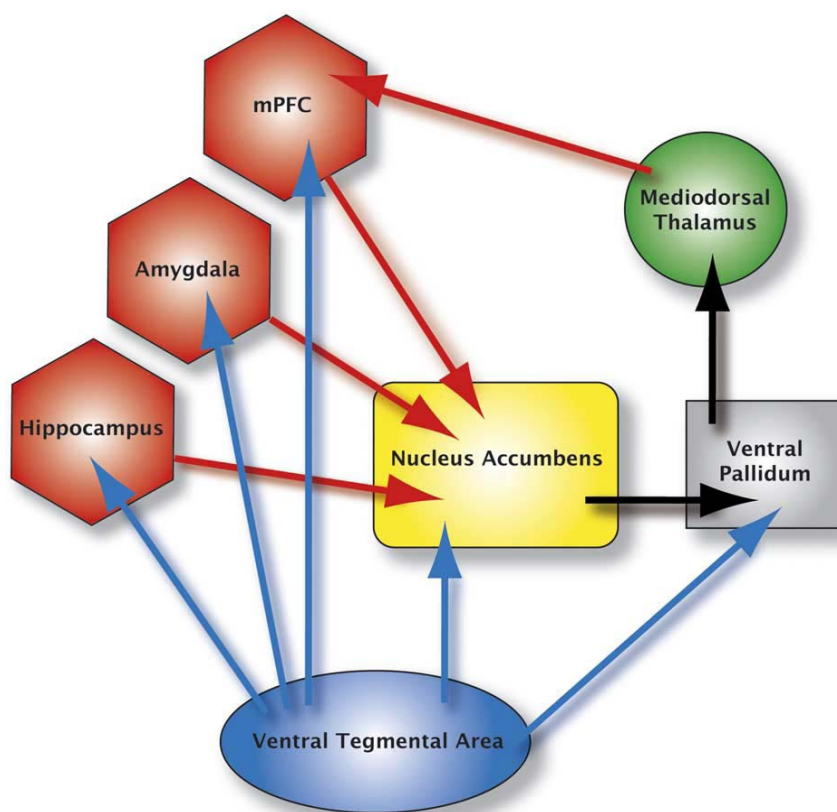
Un mecanismo que parece ser responsable para la sensibilización de los efectos estimulantes de la locomoción por cocaína es la depresión a largo plazo (LTD) en el NAc (Thomas y cols., 2001). Esta forma de plasticidad sináptica dependiente de la experiencia ha sido propuesta como causante de las neuroadaptaciones que subyacen al comportamiento adictivo (Gerdeman y cols., 2003). La LTD está promovida por la estimulación de alta frecuencia de las aferencias glutamatérgicas que conectan con las neuronas del estriado. Consecuentemente, el NAc se vuelve refractario a través de la inhibición a largo plazo de la liberación de glutamato (Robbe y cols., 2002). Muchos estudios implican por actuar como mensajeros retrógrados y por activar los receptores cannabinoides tipo 1, CB1, localizados presinápticamente (Arnold, 2005). Pero veremos cada punto con más detalle en los siguientes epígrafes.

#### **4. SISTEMA DE RECOMPENSA Y COCAÍNA.**

Las drogas de abuso producen sus efectos de refuerzo a través de sus acciones en el componente límbico de los ganglios basales, un circuito de núcleos responsables de la influencia de la información motivacional, emocional, contextual y afectiva, también denominado circuito de recompensa. Los núcleos límbicos incluyen la amígdala, el hipocampo, y el cortex prefrontal medial, que envían principalmente proyecciones



glutamatérgicas al NAc, el cual se subdivide en dos subregiones, una límbica, la corteza, y una motora, el núcleo (Heimer y cols., 1997). El NAc tiene dos salidas principales, las cuales son proyecciones GABAérgicas que se dirigen al pálido ventral y al ATV/sustancia nigra. Tanto el pálido ventral como el ATV mandan eferencias GABAérgicas al tálamo mediodorsal. Las proyecciones glutamatérgicas van del tálamo a la corteza prefrontal medial cerrando el circuito límbico (Zahm y cols., 2000). Las neuronas dopaminérgicas del VTA inervan al NAc, la amígdala, el hipocampo, córtex prefrontal y pálido ventral, y los cambios en la transmisión dopaminérgica juegan un papel crítico en la modulación del flujo de información a través del circuito límbico que comprende esos núcleos interconectados (Sesack y cols., 2003).



Las flechas rojas indican vías glutamatérgicas, las flechas negras, vías GABAérgicas y flechas azules muestran las vías dopaminérgicas. (Brenhouse, 2006).

La cocaína actúa farmacológicamente inhibiendo la recaptura de dopamina, serotonina, y noradrenalina a nivel del transportador de monoaminas, de manera que



eleva el nivel extracelular de esos neurotransmisores. A nivel de circuito, mucha de la literatura sugiere que los efectos de refuerzo de la cocaína son primariamente mediados por la intensificación de la transmisión de dopamina en el circuito de recompensa (Anderson y cols., 2005). Todas las drogas de abuso tienen en común la capacidad de incrementar la dopamina extracelular en el NAc (Di Chiara y cols., 1998). Parece que mimetizan los efectos de los estímulos reforzadores naturales y para falsear el papel normal de las neuronas dopaminérgicas (Corbille y cols., 2007).

Este circuito mesolímbico está fuertemente implicado en los procesos neuronales que subyacen a la adicción a drogas. La activación de este circuito se correlaciona con la búsqueda y el consumo de droga. La inhibición de este circuito está implicado en la disforia por abstinencia y en el deseo de droga mediado por la disforia (Gardner y cols., 2005).

Las drogas adictivas activan el núcleo del sistema de recompensa por activación de las neuronas de dopamina de la segunda estación del eje VTA-NAc, produciendo así los efectos de placer/euforia (Simon and Burns, 1997). La clave del poder de refuerzo de las drogas adictivas es que la recompensa inducida farmacológicamente es más potente e inmediata que la recompensa producida por reforzadores biológica y naturalmente esenciales (Goldstein y cols., 2001).

La pregunta que sacamos es por qué algunas personas pueden consumir drogas adictivas ocasionalmente (una copa de vino ocasional en una cena), mientras que otras se deterioran en un patrón de adicción auto-destructivo (patrones repetitivos, obsesivos y compulsivos vistos en alcohólicos). Los factores genéticos juegan un importante papel, quizá un 50% de la varianza de la gente con adicción clínicamente definida (Gardner y cols., 2005).



Estos factores de vulnerabilidad genética puede, a su vez, producir estados de deficiencia en la función dopaminérgica en las neuronas del VTA-NAc. Se ha publicado (Self and Nestler, 1995) que, en animales de laboratorio, la vulnerabilidad genética a la búsqueda y consumo de drogas se correlaciona con la deficiencia de dopamina en el eje ATV-NAc, como resultado de cambios celulares en estas neuronas de segunda estación, enfocado en una deficiencia de receptores de dopamina en lugar de dopamina por sí misma (Gardner y cols., 2005).

Una única exposición a cocaína o a otra droga de abuso induce efectos de larga duración sobre las respuestas electrofisiológicas y comportamentales, revelando su poderosa capacidad para controlar la plasticidad cerebral (Valjent y cols., 2005). Estas alteraciones persistentes participan en las complejas modificaciones que llevan a la adicción y se vinculan al craving y la recaída (Berke and Hyman, 2000).

Las neuroadaptaciones en el sistema dopaminérgico mesolímbico que acompaña al consumo crónico de drogas ofrece una explicación de por qué los consumidores de droga frecuentemente recaen después de un consumo discontinuo (Koob y cols., 2004). En el campo de la neurofarmacología, la sensibilización del sistema mesolímbico dopaminérgico parece anunciar la expresión de tales neuroadaptaciones. De acuerdo con esto, la repetición intermitente de la exposición a drogas como pueden ser la cocaína, las anfetaminas, la nicotina o la heroína produce progresivamente grandes incrementos en el flujo de dopamina inducido por la droga en el NAc, un fenómeno referido como sensibilización neuroquímica. Esto va acoplado a una respuesta locomotora progresivamente mayor a la droga (sensibilización comportamental) y a un incremento de los efectos de refuerzo positivo de la droga y a las señales relacionadas (Arnold y cols., 2005).



Un evento inesperado de refuerzo provoca múltiples formas de aprendizaje, cada una de las cuales contribuye a efectos globales de reforzamiento (Robbins and Everitt, 1996). Esto incluye aprendizaje estímulo-respuesta, asignación de significado emocional a las señales y contextos asociados con el efecto reforzador, y una potenciación de la memoria explícita para el episodio en el cual ocurre el evento. Dada una tarea ejecutada repetidamente, los circuitos neuronales más importantes para el desarrollo de la tarea pueden cambiar, reflejando un cambio en la estrategia comportamental (McDonald and White, 1993). De manera similar, muchos factores diferentes, incluyendo el aprendizaje sobre el significado emocional de las señales de la droga, la memoria explícita de la euforia, y la presión social, pueden ser responsables de las fases tempranas del consumo de drogas humano (Berke and Hyman, 2000).

La capacidad de las drogas adictivas para comprometer los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica, y así alterar el funcionamiento de circuitos específicos, es probablemente la clave de su capacidad para reforzar, y por tanto, establecer los comportamientos adictivos (Berke and Hyman, 2000).

Mediante los cambios de facilitación glutamatérgica en las sinapsis estriatales, la dopamina puede reforzar una asociación entre un conjunto particular de estímulos y una respuesta comportamental en particular. El compromiso de estos mecanismos de aprendizaje de hábitos por las drogas adictivas podría, de manera similar, promover una tendencia de las señales y contextos relacionados con las drogas para provocar comportamientos específicos, como la auto-administración de drogas (Robbins and Everitt, 1999).

Las concepciones modernas de aprendizaje y memoria reconoce la importancia de circuitos cerebrales múltiples, semi-independientes (Milner y cols., 1998). Aunque interconectados, estos circuitos diferentes contribuyen a distintos aspectos del



comportamiento. Las drogas adictivas probablemente comprometen mecanismos en varias regiones cerebrales. Estas incluyen las dianas de la inervación dopaminérgica comentadas, tales como hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (Berke and Hyman, 2000).

## **5. PAPEL DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN LAS ACCIONES DE LA COCAÍNA.**

Como ya hemos visto, el mecanismo de acción de los psicoestimulantes difiere de la de otras drogas de abuso en que afectan directamente a los terminales dopaminérgicos mesolímbicos (Rothman y cols., 2003).

La idea de que el sistema dopaminérgico cerebral juega un papel crítico en el reforzamiento no es nuevo, de hecho esta hipótesis es de la década de los 70 (Wise y cols., 1978). Aunque un gran número de opiniones han sido aplicadas a esta hipótesis a lo largo de los años (Wise y cols., 2004), ha habido otro gran número de evidencias que indican que la dopamina contribuye, al menos en parte, a los efectos de refuerzo de muchas drogas de abuso (Pierce and Kumaresan, 2006).

La transmisión dopaminérgica está mediada por receptores de membrana específicos de tipo metabotrópico. Hay cinco subtipos de receptores en el SNC de vertebrados, designados de D1 a D5. Cada subtipo de receptor dopaminérgico puede ser categorizado como D1-like (D1 y D5) o como D2-like (D2, D3 y D4), basado en la homología de la secuencia y en su farmacología (Sibley y cols., 1993).

El estriado tiene una alta densidad de receptores D1 y D2, y bajos niveles de los otros 3 subtipos (Bordet y cols., 1997). En vista de su alta densidad, nos centraremos en los subtipos D1 y D2. El receptor D1 está localizado principalmente sobre las neuronas estriatales que se proyectan a la parte interna del globo pálido/sustancia nigra, mientras



que el receptor D2 se encuentra en las proyecciones que van a la parte externa del globo pálido. Hay también autorreceptores D2 sobre los terminales dopaminérgicos (Khan y cols., 1998).

Los receptores D1 se acoplan a proteínas G inhibitorias y así estimulan a la adenil ciclasa para producir AMPc, un segundo mensajero intracelular, que a su vez activa a la protein kinasa dependiente de AMPc, PKA, la cual fosforila numerosos sustratos, incluyendo los canales de calcio tipo L, factores de transcripción tales como CREB, y otros componentes de señalización intracelular. Los receptores D2 se acoplan a proteínas Gi/Go y así inhiben a la adenil ciclasa y activan los canales de potasio rectificadores (Berke and Hyman, 2000).

Los efectos de la exposición repetida a cocaína sobre la densidad de receptores de dopamina siguen siendo un problema que parece depender de factores como el régimen de dosis, la vía de administración y la duración de los períodos de tratamiento/abstinencia (Anderson y cols., 2005). Así, se ha visto que el número de receptores D1 en el NAc son regulados a la baja (Laurier y cols., 1994) o no cambian (Sousa y cols., 1999) inmediatamente después del tratamiento crónico con cocaína, pero muestran regulación a la alta después de largos períodos de abstinencia (Unterwald y cols., 1994).

A pesar del conflicto concerniente a los cambios en la densidad de receptores, hay modificaciones inducidas por cocaína bien documentadas sobre la función y la transducción de los receptores de dopamina. Entre las neuroadaptaciones más robustas está la sensibilización de la inhibición de las neuronas del NAc, después de la exposición repetida a cocaína (Henry y cols., 1991). Esta inhibición reforzada está mediada por la supersensibilidad de los receptores de dopamina D1 (Beurrier y cols., 2002) y persistente durante meses después del cese de la administración de cocaína.



Además, la administración repetida de psicoestimulantes inicia una desensibilización transitoria de los autorreceptores D2 en el VTA, dando como resultado un incremento de la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas y amplifica la liberación de dopamina desde el NAc. Estas modificaciones inducidas por cocaína en la sensibilidad de los receptores de dopamina mesoacúmbicas probablemente reflejan alteraciones en los mecanismos de transducción de señales. El tratamiento repetido con cocaína causa una regulación a la alta de la vía de señalización del AMPc en el NAc (Unterwald y cols., 1993) y se reducen los niveles de las proteínas G inhibitorias en el VTA (Nestler y cols., 1990) y el NAc. Así, la propagación de los cambios a largo plazo asociado con el uso recurrente de cocaína ocurre a nivel funcional, quizá sin una adaptación correlativa en las concentraciones de los receptores sinápticos (Anderson y cols., 2005).

Además, hay fuertes evidencias fisiológicas y farmacológicas de que la transmisión dopaminérgica mesolímbica es crucial en la expresión de la sensibilización comportamental. Notablemente, la exposición previa a la cocaína da como resultado la sensibilización de la liberación de dopamina en el NAc en respuesta a una inyección de droga (Akimoto y cols., 1989). Además de esta respuesta presináptica, el tiempo que pasa desde la respuesta mediada por el receptor D1 en las neuronas postsinápticas del NAc a la expresión de la sensibilización comportamental sugiere que los dos procesos están íntimamente conectados. Además, los antagonistas de los receptores D1-like y D2-like atenúan la expresión de la sensibilización (Li y cols., 2000). En conjunto, estos trabajos apoyan un papel para el mecanismo dopaminérgico en la sensibilización comportamental, pero sugieren una interacción compleja de la especificidad del receptor y de la especificidad regional en la mediación de la respuesta al tratamiento repetido con psicoestimulantes. De hecho, la sensibilización inducida por cocaína muy



probablemente surge del efecto de las adaptaciones que incluyen los niveles de receptores y las resultantes cascadas de señalización (Anderson y cols., 2005).

Por otra parte, también tenemos que hablar del transportador de dopamina (DAT), que juega un papel crítico en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica, ya que se ha visto que las variaciones del DAT o los cambios en el tono basal dopaminérgico alteran el comportamiento y las respuestas a drogas (Tilley y cols., 2007). El DAT es responsable de la recaptura de dopamina y su reciclaje, y así juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis de la dopamina y en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica.

Hay múltiples evidencias que indican que el bloqueo de DAT por cocaína y la subsecuente elevación de la dopamina extracelular media la estimulación y los efectos de recompensa de la cocaína (Kuhar y cols., 1991).

Las variaciones o polimorfismos en el gen del DAT han sido asociados con cambios comportamentales y modificaciones en las respuestas a la droga (Tilley y cols., 2007). De hecho, se cree que los psicoestimulantes elevan la actividad locomotora y producen recompensa por activación del sistema dopaminérgico. Sin embargo, la cocaína produce recompensa en el ratón KO para DAT (Medvedev y cols., 2005), aunque también hay que decir que este modelo animal muestra diferencias adicionales en comparación con el WT (Tilley y cols., 2007). Es probable que la ausencia de DAT haya alterado las vías de señalización neuronal, y por tanto, no está claro como la modulación de DAT podría afectar a la actividad locomotora y a la recompensa inducida por cocaína.

Por otro lado, los cambios de la expresión génica están asociados con cambios a largo plazo en la eficacia sináptica y con cambios sinápticos estructurales. Muchos aspectos de los cambios comportamentales inducidos por drogas persistentes pueden



resultar de una conectividad sináptica alterada, sin requerir cambios persistentes en la liberación global de neurotransmisores, la sensibilidad postsináptica, o la expresión génica. A pesar de muchas investigaciones sobre la adicción y el aprendizaje asociativo a nivel comportamental, los mecanismos homeostáticos han sido un foco significativo a nivel molecular y celular (Berke and Hyman, 2000).

El factor de transcripción más ampliamente estudiado en el sistema dopaminérgico es Nurr1, un receptor nuclear de la superfamilia de receptores de hormonas esteroidea/tiroidea, esencial para la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Jankovic y cols., 2005). Nurr1 activa la transcripción de la enzima limitante de la biosíntesis de catecolaminas, la tirosina hidroxilasa, TH, y los genes de DAT y del transportador vesicular de monoaminas tipo 2.

El papel de Nurr1 en la maduración del mesencéfalo no está claro, aunque hay datos que sugieren que su expresión puede ser requerida para la propia neurotransmisión y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas en adulto (Jankovic y cols., 2005). Las alteraciones genéticas en el locus de Nurr1 han sido asociadas con el déficit de atención e hiperactividad (Smith y cols., 2005) y con el Parkinson (Jankovic y cols., 2005).

## **6. PAPEL DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LAS ACCIONES DE LA COCAÍNA.**

La neurotransmisión glutamatérgica en el NAc modula la liberación de dopamina (Wu y cols., 1993) y está relacionada con la hiperlocomoción y con el comportamiento de búsqueda inducido por cocaína (Pulvirenti y cols., 1992). Estos descubrimientos sugieren que la interacción glutamato-dopamina en el NAc está



implicada en el desarrollo de la sensibilización comportamental y propiedades de refuerzo de la cocaína (Yamaguchi y cols., 2002).

El aminoácido glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de vertebrados (Collingridge and Lester, 1989), y por tanto su síntesis y degradación en el cerebro recibe una considerable atención. El glutamato es utilizado como transmisor o para el metabolismo general, y el aminoácido glutamina (Gln) juega un importante papel en ambos procesos (Fonnum y cols., 1984 and Erecinska and Silver, 1990).

La glutaminasa activada por fosfato, a la que nos referiremos como GA, cataliza la reacción de glutamina a glutamato y amonio (Krebs y cols., 1935). En mamíferos, la enzima necesita de fosfato inorgánico para la actividad in vitro y juega un papel clave en varios procesos fisiológicos, tales como la amoniogénesis renal, la ureagénesis hepática y la síntesis del neurotransmisor glutamato en cerebro (Curthoys and Watford, 1995). La glutaminasa también inicia el catabolismo de la glutamina la cual es muy importante para las necesidades energéticas de las células (Kovacevic and McGivan, 1983).

Según la vista clásica de la expresión de glutaminasa en mamíferos, hay dos isoenzimas principales tradicionalmente denominados tipo hígado y tipo riñón. En rata, la LGA parece estar presente solo en la mitocondria de hígado de los animales adultos (Smith and Watford, 1990), mientras que la enzima tipo-k fue encontrada en el riñón de rata, cerebro, intestino delgado, linfocitos e hígado fetal (Curthoys and Watford, 1995). Ambas formas enzimáticas de la glutaminasa muestran una cinética y características inmunológicas y moleculares diferentes, (Kovacevic and McGivan, 1983). La inhibición enzimática por el producto final (Glu) ha sido la marca para diferenciar entre la KGA (fuertemente inhibida) y la LGA (no inhibida).



Este patrón clásico de expresión de la glutaminasa en los mamíferos ha sido recientemente descubierta por nuevas evidencias experimentales. Así, la isoenzima LGA se ha demostrado que se expresa en otros tejidos aparte del hígado adulto, como cerebro, páncreas, y células de cáncer de mama (Gómez-Fabre y cols., 2000). Por otra parte, la isoforma K parece ser ubicua y se encuentra en todos los tejidos con actividad glutaminasa. Sin embargo, la expresión simultánea de ambas isoenzimas es un evento más frecuente de lo que se pensaba (Aledo y cols., 2000). La co-expresión de las dos Gas en el cerebro e mamíferos lleva a varias cuestiones con significados fisiológicos, como por ejemplo, cual es la razón de tener dos isoformas de la glutaminasa.

Los otros componentes del sistema glutamatérgico son los receptores ionotrópicos de glutamato, que juegan un papel significativo en la regulación de una gran variedad de actividades celulares y sinápticas, incluyendo aprendizaje y memoria (Zorumski and Izumi, 1998), la efectividad de las propiedades adictivas y neurotóxicas de las drogas de abuso (Nestler y cols., 2005), y los fenotipos de varias formas de desordenes neurodegenerativos (Sattler y Tymianski, 2001). Los miembros principales de los receptores ionotrópicos de glutamato, incluye el receptor NMDA y los receptores AMPA y Kainato. Cada subclase de receptores son un heterómero de subunidades que forma un canal iónico funcional (Liu y cols., 2006).

Las múltiples subunidades del receptor NMDA son heterogéneas en términos de distribución y propiedades farmacológicas (Yamakura y cols., 1999). El receptor NMDA está compuesto por una subunidad NR1, junto con distintas subunidades NR2, las cuales en conjunto contribuyen a las características funcionales del receptor. Los niveles de mRNA del NR1 están alterados en el VTA de ratas tratadas con repetidas inyecciones de cocaína (Yamaguchi y cols., 2002).



Por tanto, la transmisión glutamatérgica juega un papel activo en las acciones de las drogas (Kalivas y cols., 2004) ya que el estriado está abundantemente innervado con aferencias glutamatérgicas, y los receptores NMDA, principalmente las subunidades NR1 y NR2B, están densamente expresadas en las neuronas estriatales (Kuppenbender y cols., 2000).

La interacción dopamina-glutamato es el factor clave en las acciones de los estimulantes. Los estudios más recientes se enfocan hacia los mecanismos moleculares que subyacen a la interacción. Los datos disponibles muestran que la estimulación dopaminérgica puede regular los niveles totales de tráfico de NMDA, AMPA y los receptores fijados a proteínas (Boudreau and Wolf, 2005).

Tanto los receptores de dopamina como de glutamato son densamente expresados en las neuronas estriatales. Las interacciones activas entre ellos parecen ocurrir a nivel de receptor. De hecho, hay resultados que revelan la unión directa entre el tercer loop del receptor D2 y la región C-terminal de NR2B. Los estudios electrofisiológicos proporcionan evidencias que apoyan la inhibición de las corrientes de NMDA por el receptor D2 a través de la interacción con NR2B. Comportamentalmente, la interacción D2-NR2B es crítica para las respuestas comportamentales a la administración aguda de cocaína (Liu y cols., 2006).

NR2B en el estriado está regulado por las fibras glutamatérgicas corticoestriatales excitatorias o por agonistas D1 (Rodríguez-Puertas y cols., 1999). Sin embargo, la actividad de NR2B con respecto al receptor NMDA es más importante que la del NR2A (Kohr y cols., 1994) y muestra una sensibilidad muy fuerte al ifenprodil, un antagonista selectivo del NMDA (Chenard and Menniti, 1999). El ifenprodil ayuda a incrementar la locomoción en modelos animales de Parkinson (Nash y cols., 1999). Esta evidencia por tanto, indica que el receptor NMDA que contiene NR2B en el estriado



está recíprocamente implicado en la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Consecuentemente, los cambios en la expresión de NR2B en estas regiones podría estar asociado con la transmisión glutamatérgica alterada en la iniciación de la sensibilidad (Yamaguchi y cols., 2002).

La fosforilación de proteínas es un importante mecanismo de modulación postranscripcional de la función del receptor de glutamato (Rostas y cols., 1996). El NR2B es fosforilado en la posición Ser1303 (Omkumar y cols., 1996). Esta fosforilación se lleva a cabo por la CaMKII, una kinasa abundante en la zona postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas (Nelly, 1984), o por la proteína kinasa C (Liado y cols., 2001). Las evidencias muestran consistentemente que la fosforilación de NR2B regula positivamente las corrientes mediadas por el receptor NMDA (Rostas y cols., 1996) y afecta a la vía de señalización de este receptor regulando el tráfico y la interacción con las proteínas de señalización sináptica (Chung, 2004).

Con respecto a NR2C, aunque su significado funcional no se conoce aún, las evidencias apoyan la idea de una relación funcional muy estrecha entre NR2C y los receptores metabotrópicos de glutamato en el cerebelo (Pizzi y cols., 1999).

El receptor de glutamato mGluR5, perteneciente al grupo I de receptores metabotrópicos (mGluR1 y mGluR5) está acoplado a la fosfolipasa C a través de la proteína Gq (Pin and Duvoisin, 1995). En el hipocampo, mGluR5 está localizado en el elemento postsináptico (Shigemoto y cols., 1997), y juega un importante papel en el aprendizaje, memoria y en la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo de rata. Los ratones KO para mGluR5 muestran un aprendizaje dañado y una reducida LTP en el área CA1 del hipocampo (Lu y cols., 1997). Se ha demostrado que con la administración crónica de cocaína, mGluR5 es inducido en la corteza del NAc (Ghasemzadeh y cols., 1999). Por tanto, con las sabidas funciones de mGluR5 en el



hipocampo, niveles aumentados de este receptor podrían contribuir al mecanismo de los cambios adaptativos (Freeman y cols., 2001).

Por último, los receptores AMPA están compuestos por cuatro subunidades (GluR1-GluR4) que combinados forman receptores funcionalmente diferentes (Hollmann and Heinemann, 1994). Hay considerables evidencias de que las subunidades del receptor AMPA están alteradas en respuesta a la repetida administración de cocaína (Zavala y cols., 2007).

Sin embargo, un incremento en la expresión de GluR1 en el NAc es evidente en ratas que exhiben un comportamiento sensibilizado en respuesta a cocaína (Boudreau and Wolf, 2005), sugiriendo una implicación de GluR1 en la neuroplasticidad inducida por cocaína (Wolf y cols., 2004). En conjunto, todos los descubrimientos sugieren un papel crítico también para las subunidades del receptor AMPA en los cambios comportamentales resultantes de la administración de cocaína (Zavala y cols., 2007).

## **7. PAPEL DEL SISTEMA CANNABINOIDE EN LAS ACCIONES DE LA COCAÍNA.**

Después de la identificación (Devane y cols., 1988) y el clonaje (Matsuda y cols., 1990) del primer receptor cannabinoide, CB1 y en vista de la existencia de un sistema de señalización receptor opiáceo-opiáceos endógenos, fue natural comenzar a buscar ligandos endógenos para el receptor cannabinoide. Para realizar el descubrimiento del primer ligando endógeno se pensó que podría ser lipofílico (Mechoulam y cols., 1995) y resultó ser la etanolamida del ácido araquidónico (20:4, n-6) y fue denominado como anandamida (Devane y cols., 1992). Un segundo tipo de endocannabinoides fue descubierto en 1995, también un derivado del ácido araquidónico, pero en este caso su ester, el 2-araquidonilglicerol o 2-AG (Mechoulam y



cols., 1995; Sigiura y cols., 1995). Muy recientemente, se ha descrito un tercer ligando, el eter del ácido araquidónico, denominado noladin eter (Hanus y cols., 2001). El sistema de señalización endocannabinoide, compuesto por los endocannabinoides, su(s) receptor(es), mecanismo de recaptura y enzimas de hidrólisis, es filogenéticamente antiguo, discurriendo a través de las especies de vertebrados (Elphick y cols., 2001) e invertebrados (Salzet y cols., 2000).

Los endocannabinoides son sintetizados en neuronas y astrocitos, y son degradados por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y también tienen alta afinidad por la recaptura. La distribución del receptor CB1 en circuitos cerebrales discretos ha sido mapeada especialmente en las áreas relacionadas con la recompensa (Freund y cols., 2003). Además, los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados, sintetizados a demanda y son liberados de la membrana postsináptica, modulando así la liberación de neurotransmisores (Arnold y cols., 2005).

Los recientes avances farmacológicos han llevado a la síntesis de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides, bloqueantes de la recaptura de anandamida e inhibidores selectivos de la degradación de los endocannabinoides. Estas herramientas hacen posible el estudio del papel fisiológico de los endocannabinoides y abre nuevas vías de investigación de estrategias en el tratamiento del dolor, obesidad, desordenes neurológicos, como puede ser la adicción a drogas (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005).

Las concentraciones en el cerebro del 2-AG son aproximadamente 200 veces más altas que la de anandamida. El orden de distribución de ambos cannabinoides en diferentes áreas es similar: mayor en el tronco cerebral, estriado y cerebelo y menor en corteza y diencefalo. No se encontró correlación entre las concentraciones de endocannabinoides y la distribución de CB1. La pérdida de asociación entre estos dos



componentes, sin embargo, no es sorprendente, las explicaciones adicionales han incluido la existencia de una diana molecular que no sea el receptor CB1 (Fride y cols., 2002).

El receptor CB1 está acoplado a proteínas Gi/o, de manera que modula a la adenil ciclasa, a los canales iónicos y a las kinasas reguladas por señales extracelulares (Self y cols., 1999). Recientemente, se ha determinado que el receptor CB1 está también acoplado a ceramidas, un segundo mensajero lipídico, el cual a su vez media la apoptosis inducida por cannabinoides (Fride y cols., 2002).

La afinidad y unión de los endocannabinoides por otros receptores, como el vanilloide, tiene que ser tenido en cuenta para comprender completamente la fisiología de los cannabinoides. Sin embargo, las posibles interacciones con los receptores de los ácidos lisofosfatídicos también merecen atención.

Las áreas de actividad centrales de los endocannabinoides incluyen reducción del dolor, regulación motora, aprendizaje/memoria, y recompensa. Finalmente, el papel del sistema endocannabinoide en la estimulación del apetito en el organismo adulto, y su implicación crítica en la ingestión de leche y la supervivencia del recién nacido (Fride y cols., 2002).

El sistema endocannabinoide es ciertamente el sitio de acción primario para las respuestas farmacológicas y de recompensa inducidos por los cannabinoides (Lichtman y cols., 2005). Sin embargo, este sistema juega un efecto global modulador sobre el circuito de recompensa y también participa en la recompensa y las propiedades adictivas de todas las drogas de abuso (Berke and Hyman, 2000; Gorriti y cols., 1999).

El receptor CB1 se expresa en las neuronas estriatonigrales que expresan sustancia P y receptores de dopamina D1, así como en las neuronas estriatopalidales que expresan encefalina y receptores de dopamina D2. Esto indica que el sistema



endocannabinoide es un modulador negativo de los comportamientos mediados por los receptores de dopamina D1 y D2 (Martín y cols., 2007).

Todas las evidencias indican que el sistema endocannabinoide es un importante constituyente de los sustratos neurales implicados en la adicción (Cipitelli y cols., 2007). Así, el sistema endocannabinoide puede ofrecer una nueva diana para el tratamiento de la adicción a drogas. Esto puede ser especialmente importante en el tratamiento del abuso de cocaína, para lo que no hay fármacos efectivos (Sipe y cols., 2002). Sin embargo, los nuevos hallazgos en el campo de la neurobiología sobre como el cerebro cambia por el tratamiento crónico con cocaína revela nuevas dianas para el desarrollo de terapias. Ciertas drogas actualmente están siendo clínicamente testadas apuntan a la neuroplasticidad inducida por cocaína, incluyendo drogas que promueven la liberación de GABA o la inhibición de la transmisión glutamatérgica (Kalivas y cols., 2007).

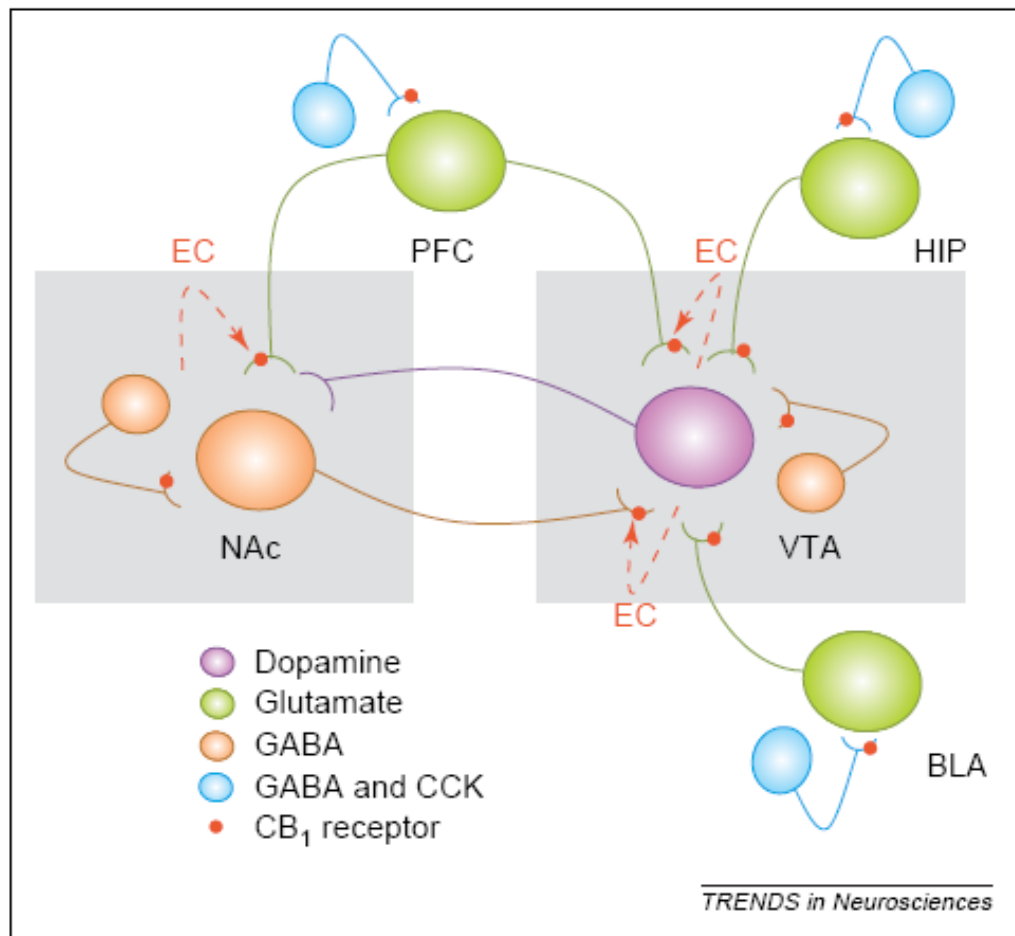
Muchos estudios muestran semejanzas en las acciones neurofarmacológicas de los cannabinoides y la cocaína, proporcionando evidencias de que los endocannabinoides podrían jugar un importante papel en la adicción a cocaína. La administración de cannabinoides o cocaína incrementa la expresión de los genes de expresión temprana, c-fos, en las regiones cerebrales relacionadas con la recompensa, tales como el NAc y el cortex prefrontal. Además, la exposición a cocaína o del principal psicoactivo del cánnabis, el THC, promueven un incremento en la liberación de dopamina en el NAc (Ferrer y cols., 2007). Otro dato es que la inyección, tanto de cannabinoides como de cocaína, directamente en el NAc promueve una inhibición de la transmisión sináptica excitatoria en estas regiones cerebrales (Arnold y cols., 2005).

La dopamina y los endocannabinoides son neurotransmisores conocidos por jugar un importante papel en la actividad del circuito motor de los ganglios basales (Julian y



cols., 2003). De hecho, las neuronas dopaminérgicas de la vía mesocorticolímbica están controladas por inputs excitatorios e inhibitorios que son modulados por el receptor CB1. Así, los endocannabinoides pueden ser liberados después de la despolarización en el NAc (Robbe y cols., 2002) y desde las neuronas dopaminérgicas en el VTA (Riegel y cols., 2004), modulando así las aferencias glutamatérgicas y gabaérgicas por actuar como mensajeros retrógrados sobre los receptores CB1. La presencia de CB1 en otras estructuras relacionadas con la recompensa y la motivación, así como la amígdala basolateral y el hipocampo, también contribuyen a esta función del sistema endocannabinoide (Katona y cols., 2001). Además, los endocannabinoides participan en la plasticidad sináptica en el sistema mesolímbico. La estimulación de las aferencias del córtex prelímbico produce LTD de las sinapsis glutamatérgicas del NAc, mediada por la liberación de endocannabinoides y por los receptores CB1 presinápticos (Gerdeman y cols., 2002). Los endocannabinoides también producen LTD de la transmisión sináptica inhibitoria en el hipocampo y prepara las sinapsis excitatorias para facilitar la subsecuente inducción de la LTP (Chevaleyre y cols., 2004), lo cual contribuye a los mecanismos de plasticidad publicados, en los procesos de aprendizaje relacionados al comportamiento adictivo (Maldonado y cols., 2006).

Así, el HU210 puede incrementar la liberación de dopamina en el NAc y actuar como activador de la restauración de la búsqueda de cocaína (De Vries y cols., 2001). Recíprocamente, asumiendo un tono significativo de endocannabinoides, el bloqueo de los receptores CB1 presinápticos con SR14176A en la sinapsis corteza-NAc podría promover la liberación de glutamato, iniciando la transmisión GABAérgica y así inhibir el VTA. Como la dopamina es un importante mediador de la recaída por cocaína (Shalev y cols., 2002), la disminución resultante en la liberación de dopamina en el NAc podría atenuar la transmisión sináptica necesaria para la recaída a cocaína.



Sitios de acción de los endocannabinoides en la modulación de los efectos de recompensa de las drogas. En el área tegmental ventral (VTA), CB1 está localizado presinápticamente en las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas. Por el contrario, las neuronas dopaminérgicas del VTA no expresan CB1. La activación de CB1 en el VTA por endocannabinoides (EC; flechas rojas discontinuas) produce la inhibición de la liberación de GABA, eliminando así el efecto inhibitorio de esas células GABAérgicas sobre las neuronas dopaminérgicas. Además, el de la actividad dopaminérgica induce la liberación de cannabinoides desde las células dopaminérgicas que, actuando de manera retrógrada sobre los receptores CB1 presinápticos, inhiben tanto a las neuronas GABAérgicas inhibitorias, como a las glutamatérgicas que llegan al VTA. Las proyecciones glutamatérgicas de la amígdala basolateral (BLA) y el hipocampo (HIP), los cuales están implicados en los procesos de motivación y memoria relacionados con los efectos de recompensa de las, están también bajo el control de los receptores CB1, a través de un efecto inhibitorio sobre las neuronas inhibitorias presinápticas que liberan tanto GABA como colecistoquinina (CCK). En el núcleo acumbens (NAc), los endocannabinoides tienen una acción retrógrada moduladora actuando principalmente sobre los receptores CB1 localizados en el axón de las neuronas glutamatérgicas. La subsecuente inhibición de la liberación de glutamato inhibe a las neuronas GABAérgicas que proceden del NAc y se proyectan al VTA, activando así indirectamente a las neuronas dopaminérgicas del VTA.



Desafortunadamente, esta teoría podría sobrevalorar el papel de la dopamina ya que hay muchas evidencias que apoyan la idea de que el glutamato podría contribuir más que la dopamina (Kalivas y cols., 2004).

De hecho, los mecanismos precisos que subyacen al papel modulador del sistema endocannabinoide sobre los efectos de recompensa de los psicoestimulantes parecen ser independientes de los efectos de activación del sistema de transmisión mesolímbico dopaminérgico. Así, el aumento de los niveles de dopamina extracelular producidos por la cocaína en el NAc no fueron modificados en el ratón KO para CB1 (Soria y cols., 2005). La activación del circuito mesolímbico es esencial para que los psicoestimulantes induzcan sentimientos de recompensa, y el receptor CB1 no sería, por tanto, requerido para obtener los efectos de refuerzo de la cocaína. La participación de CB1 en la motivación para el mantenimiento del comportamiento de auto-administración de cocaína podría, por tanto, implicar a otros sistemas neuroquímicos relacionados a este complejo comportamiento adictivo. Así, las anfetaminas liberan endocannabinoides en la amígdala para producir LTD por un mecanismo independiente de dopamina mediado por CB1, y esos endocannabinoides participan en la plasticidad sináptica producida por psicoestimulantes en las estructuras mesocorticales (Wolf y cols., 2004). De esta manera, aunque el sistema endocannabinoide no participa en los efectos de refuerzo primario de los psicoestimulantes, es importante para el mantenimiento del comportamiento de búsqueda de psicoestimulantes, probablemente por la modulación de procesos sinápticos inducidos por esas drogas (Maldonado y cols., 2006).



## 8. PAPEL DEL RECEPTOR PPARA EN LAS ACCIONES DE LA COCAÍNA

Las amidas de ácidos grasos de cadena larga con etanolaminas comprenden una familia de moléculas de señalización lipídicas (Lambert and Di Marzo, 1999) que incluyen a la plamitiletanolamida (PEA, Calignano y cols., 2001), oleiletanolamida (OEA, Rodríguez de Fonseca y cols., 2001) y la araquidoniletanolamida (anandamida, ANA) el primer agonista endógeno para los receptores cannabinoides identificados (Devane y cols., 1992).

La presencia y distribución de ANA en el SNC ha sido demostrada con la localización en el hipocampo y el tronco cerebral (Bisogno y cols., 1999). PEA y OEA han sido detectadas también en muestras biológicas (Giuffrida y cols., 2000).

Farmacológicamente, ANA mimetiza mucho de los efectos causado por el THC, el principal psicoactivo de la marihuana (Mechoulam and Gaoni, 1964), sobre diversos comportamientos tales como la interrupción de la memoria, la hipolocomoción, la hiperfagia y el sueño (Fride and Mechoulam, 1993; Murillo-Rodríguez y cols., 2001). Recientes estudios demostraron que PEA muestra algunas propiedades biológicas. De hecho, Calignano y colaboradores (2001) publicaron que este compuesto actúa como una molécula antinociceptiva (Capasso y cols., 2001), a la vez que disminuye el tránsito intestinal (Lo Verne y cols., 2005). Finalmente, la OEA tiene poco o no tiene efecto sobre el comportamiento frente al dolor evocado con formalina (Calignano y cols., 2001), pero podría estar implicado en los mecanismos de saciedad. Esta acción anoréxica en ratas no es bloqueada por los antagonistas específicos de los receptores cannabinoides (Rodríguez de Fonseca et al., 2001). Este efecto anoréxico implica al receptor PPAR $\alpha$  (Fu y cols., 2003).

El receptor activado por el proliferador de peroximas alfa, PPAR $\alpha$ , es miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, la cual incluye al receptor de la



vitamina D, el receptor del ácido retinoico, el receptor de la hormona tiroidea y los receptores de esteroides. La subfamilia PPAR incluye tres miembros codificados por diferentes genes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (este último tiene dos isoformas, 1 y 2) (Desvergne and Wahli, 1999). Los tres PPAR se distinguen en sus patrones de expresión específicos de tejido, estadio de desarrollo y por la diferente capacidad de ligandos eicosanoides y lípidos naturales de activar cada receptor (Ding y cols., 2007).

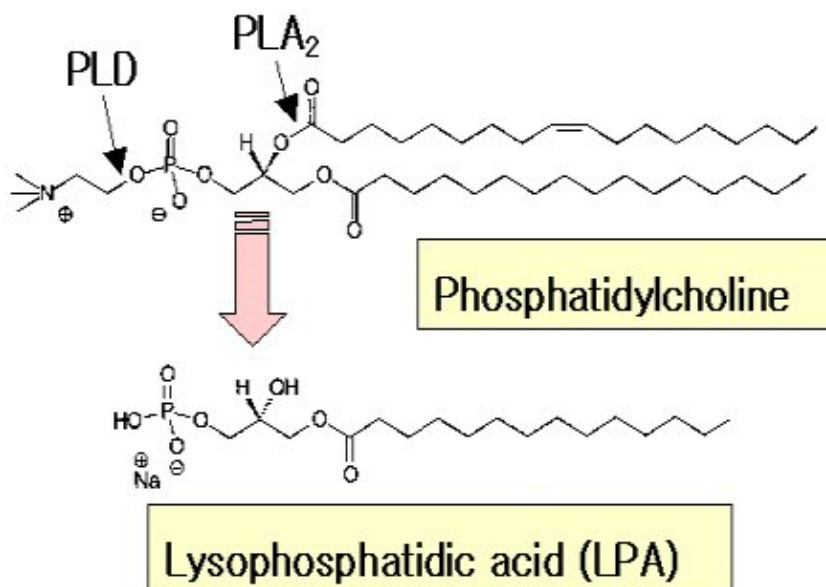
Se sabe que los PPAR regulan una amplia variedad de genes diana implicados en el catabolismo celular de los lípidos y su almacenaje. Además de mediar los efectos de los proliferadores de peroxisomas y el control de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, los miembros de la familia PPAR son también requeridos para la diferenciación de varios tipos celulares, incluyendo células nerviosas, células adiposas y algunos tipos de células tumorales (Park y cols., 2004; Rosen y cols., 1999).

PPAR $\alpha$  está muy expresado en tejidos que tienen altas demandas de energía, tales como corazón, músculo esquelético, riñón, hígado y cerebro (Kliwer y cols., 1994). El incremento prominente del mRNA de PPAR $\alpha$  ha sido observado en el corazón durante el desarrollo embrionario (Steinmetz y cols., 2005). Este incremento en la expresión disminuye antes del nacimiento, sugiriendo que este receptor es crítico para el desarrollo. Los ratones KO para PPAR $\alpha$  muestran hipoglucemia, una cetogénesis inadecuada, acumulación de lípidos en corazón e hígado, y tienen una tasa de muerte muy alta en relación con el WT (Leone y cols., 1999).



## 9. ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO: UN NUEVO NEUROMODULADOR. PAPEL EN LAS ACCIONES DE LA COCAÍNA.

El ácido lisofosfatídico o monoacil-sn-glicerol-3-fosfato, es un mediador lipídico con una amplia variedad de acciones biológicas, particularmente como un inductor de la proliferación celular, la migración y la supervivencia.



La investigación del LPA comenzó alrededor de 1990 con el descubrimiento de la acción mitogénica del LPA sobre fibroblastos. Después su investigación se estimuló por el descubrimiento de que el LPA es el principal constituyente del suero (Eichholtz y cols., 1993; Tigyi y cols., 1992) y de sus acciones diversas y potentes en casi todos los tipos celulares de mamíferos. Después de esto llegó la identificación de su receptor (Hech y cols., 1996; Contos y cols., 2000). Desde su caracterización como factor de crecimiento, la lista de respuestas celulares se ha expandido considerablemente y ahora también incluye efectos no proliferativos.

La larga lista de actividades del LPA podría parecer confusa, pero es congruente con la gran diversidad de vías de señalización mediadas por proteínas G identificadas (Moolenaar y cols., 1999). El LPA no solo señala vías clásicas de segundos



mensajeros, sino que también activa a la familia de GTPasas Ras y Rho para controlar la proliferación celular, migración y morfogénesis.

Los principales efectos del LPA sobre las células derivadas del SNC son:

- es un potente inductor del colapso del cono de crecimiento y la retracción de la neurita, lo cual fue originariamente observado en líneas celulares neuronales (Tigyi y cols., 1992; Jalink y cols., 1994), lo cual también se ha visto que ocurre en neuronas primarias y en neuroblastos corticales (Fukushima y cols., 2000)
- en astrocitos derivados de cerebro, el LPA causa inversión de los procesos de crecimiento (Ramakers and Moolenaar, 1998)
- simultáneamente a la retracción de la neurita, el LPA activa una corriente de despolarización de cloruro que modula la excitabilidad de la membrana (Postma y cols., 1996; Postma y cols., 2001)
- estudios en neuroblastos corticales implican al LPA en la producción de cambios de conductancia iónica similar a los producidos por neurotransmisores, durante el desarrollo cerebral (Bubin y cols., 1999)

Todos estos efectos in vitro seguramente tengan implicaciones in vivo, como la retirada de la neurita y la vuelta al cono de crecimiento, que es fundamental para el desarrollo del SNC y la plasticidad neuronal.

- en células endoteliales derivadas de cerebro, el LPA incrementa la permeabilidad de las uniones fuertes, lo que sugiere que podría modular la función de la barrera hematoencefálica (Schulze y cols., 1997)



- el LPA parece ser que promueve la mielinización y/o neurodegeneración debido al descubrimiento de que, por una parte, promueve la supervivencia y la adhesión célula-célula de las células de Schwann del SNP (Weiner y cols., 1999; Weiner y cols., 2001) y, por otra parte, el LPA puede hiperfosforilar a la proteína Tau asociada a microtúbulos, un marcador de Alzheimer (Sayas y cols., 1999)
- por último, un efecto neurogénico notable del LPA es observado en un sistema cortical ex vivo. El tratamiento con LPA de hemisferios corticales embrionicos de ratón les causa expansiones y plegamientos en la estructura que hace que se parezcan al cerebro primario, en lugar de liso, como es la superficie cortical de ratón (Jalink y cols., 1993). Los plegamientos eran más espesos y contenían más células que los controles, debido a un incremento en la mitosis celular y a una reducción de la apoptosis neuronal de las células progenitoras en lugar de un incremento en la síntesis del DNA. La implicación de este sorprendente descubrimiento es que la señalización del LPA podría contribuir al desarrollo cerebral de primates.



Vista comparativa del cerebro de un ratón *wild-type* (izquierda) y un ratón knock out (derecha) para el gen que expresa el receptor LPA1a.



Basado en secuencias homólogas, los receptores de LPA de mamíferos pertenecen a la subfamilia denominada Edg (genes de diferenciación endotelial) de la superfamilia de receptores metabotrópicos de 7 dominios transmembrana. Los receptores de LPA de alta afinidad fueron detectados inicialmente por foto-afinidad años después de que el gen del primer receptor de LPA fuera identificado (van der Bend y cols., 1992). Esto abrió el camino a la identificación de dos receptores LPA (Hecht y cols., 1996), y de cinco miembros adicionales de la familia Edg que codifican receptores para otro mediador lipídico, la esfingosina-1-fosfato (S1P). La reciente identificación de un cuarto receptor específico de LPA fuertemente relacionado con los receptores purinérgicos (Noguchi y cols., 2003), lo que añade una diversidad inesperada a la familia de receptores de lisofosfolípidos.

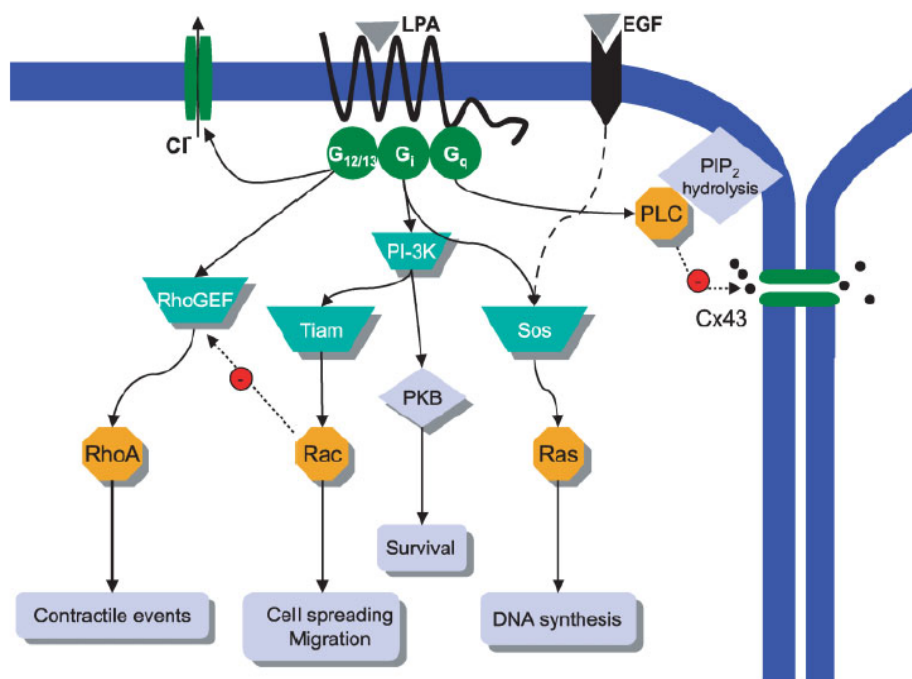
El LPA 1 es el subtipo más ampliamente expresado y el mejor caracterizado, pero los tres receptores de LPA de la familia Edg muestran una secuencia del 50% de similitud entre sí, pero sus colas C-terminales tienen mayor divergencia. En común con otros receptores metabotrópicos, los receptores sufren una rápida internalización inducida por ligando desde la membrana plasmática (van Leeuwen y cols., 2003). El destino metabólico del receptores internalizado (degradación o reciclaje) está aún por esclarecer.

El receptor de LPA puede acoplarse con al menos tres subfamilias distintas de proteínas G (Moolenaar y cols., 1999). Las principales rutas de señalización están resumidas en la figura, e incluyen:

- $G_{\alpha q}$ : estimula a la fosfolipasa C con la subsecuente hidrólisis del  $PIP_2$  y la movilización de calcio de los reservorios internos
- $G_i$  tiene varios efectos:



- inhibe a la adenil ciclasa lo que provoca una disminución de los niveles de AMPc.
  - además, media la estimulación de la cascada de las MAP kinasas y de Ras
  - activa a la fosfoinositol-3-kinasa (PI3K) y consecuentemente activa a Rac y promueve el movimiento celular y suprime la muerte celular, respectivamente
- $G_{12/13}$  median la activación de RhoA y regula así la contracción del citoesqueleto por actinmiosina, acompañada por la despolarización de la membrana mediada por cloro



Principales vías de señalización del receptor de LPA.



El mecanismo de biosíntesis del LPA no ha sido conocido hasta hace poco. En condiciones patofisiológicas puede ser generado por la PLA2, la cual hidroliza el ácido fosfatídico (PA) expuesto en la superficie de células sanguíneas, bajo condiciones inflamatorias (Fourcade y cols., 1995). Pero no está claro que esta enzima participe en la producción de LPA bajo condiciones fisiológicas normales, ya que la PLA2 extracelular normalmente no puede degradar fosfolípidos en células intactas (van Corven y cols., 1989).

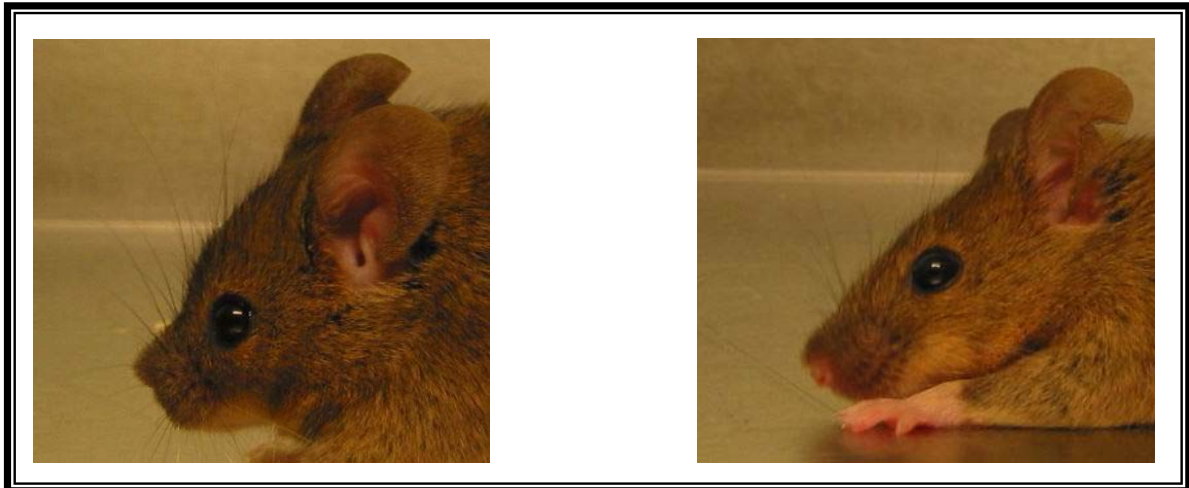
La acumulación del LPA debe ser contrabalanceada por la inactivación del LPA, y al igual puede ser regulada por degradación; de hecho se conoce que en las células mamarias se degrada por eliminación del grupo fosfato para producir un monoacilglicerol biológicamente inactivo (van der Bend y cols., 1992). Un trabajo más reciente ha identificado una familia de fosfohidrolasas (LPP) que median la desfosforilación del LPA y de otros fosfolípidos; son ecto-enzimas de membrana que han sido propuestas para regular negativamente la señalización del LPA (Brindley and Waggoner, 1998). El problema de estas enzimas es que tienen poca especificidad y los valores de la  $K_m$  para LPA quedan lejos de la  $K_d$  del receptor LPA. Ratones transgénicos con sobreexpresión de la isoforma LPP-1 tienen unos niveles plasmáticos de LPA indistinguibles de la de los animales wild-type (Yue y cols., 2004).

Más que controlar la duración de la señal del LPA y su potencia, parece más probable que la actividad LPP sirva para prevenir la excesiva acumulación de fosfolípidos en la membrana plasmática. La desensibilización del receptor inducida por LPA es probablemente el mecanismo principal por el cual la señalización del LPA está regulada negativamente.

El receptor LPA1 se identificó originariamente en neuroblastos corticales y mostró tener un patrón de expresión restringido espacial y temporalmente durante el



desarrollo y la edad adulta del cerebro (Hecht y cols., 1996; An y cols., 1997). El LPA1 primero apareció en la zona ventricular del córtex cerebral del embrión y es expresado en las capas neuroepiteliales hasta poco antes del nacimiento (Allard y cols., 1998). La expresión vuelve a ocurrir durante la mielinización glial del sistema nervioso durante la edad adulta.



Vista comparativa lateral de un ratón wild-type (derecha) y un ratón knock out para el gen que expresa el receptor LPA1a (izquierda). A simple vista se pueden observar las características típicas descritas en el texto.

Uno de los principales intereses en comprender el papel de este receptor fue demostrar la hipótesis relacionada con el desarrollo etiológico de varias enfermedades psiquiátricas. Y para ello se generaron ratones mutantes en el receptor LPA1. Estos ratones knock out para LPA1 muestran una letalidad parcial debido a un reflejo de succión defectuosa, que también es atribuido a defectos en el olfato (Contos y cols., 2000; McGiffert y cols., 2002). Otros fenotipos incluyen talla reducida y anomalías craneofaciales que aparecen durante la segunda semana postnatal (Contos y cols., 2000). La longitud de ojo a nariz es más corta y los ojos están más separados. Además son un 10-15% más pequeños que las camadas de los *wild-type* y tienen menor masa corporal. En este punto es interesante hacer notar que las deformaciones craneofaciales se han



visto en algunos casos de esquizofrenia y también en la psicosis (Waddington y cols., 1999).

Los resultados que se han obtenido con estos ratones KO para el receptor LPA1 son:

- en estudios inmunohistoquímicas se confirma la ausencia del receptor en los tractos de materia blanca, estructuralmente normales
- en estudios electrofisiológicos del hipocampo no aparecen anomalías a pesar de que hay cambios en los niveles de aminoácidos
- en los estudios comportamentales se ha visto que los ratones KO se muestran normales aunque tienen una pequeña disminución en la actividad locomotora del 10%
- en los análisis neuroquímicos se ha observado:
  - o disminución del turnover de serotonina en el córtex frontal, hipocampo, hipotálamo y núcleo acumbens
  - o por tanto, hay un significativo descenso de los niveles de 5-HIAA en las mismas zonas
  - o un aumento de los niveles de dopamina en estriado



**OBJETIVOS  
Y  
DISEÑO EXPERIMENTAL**

---

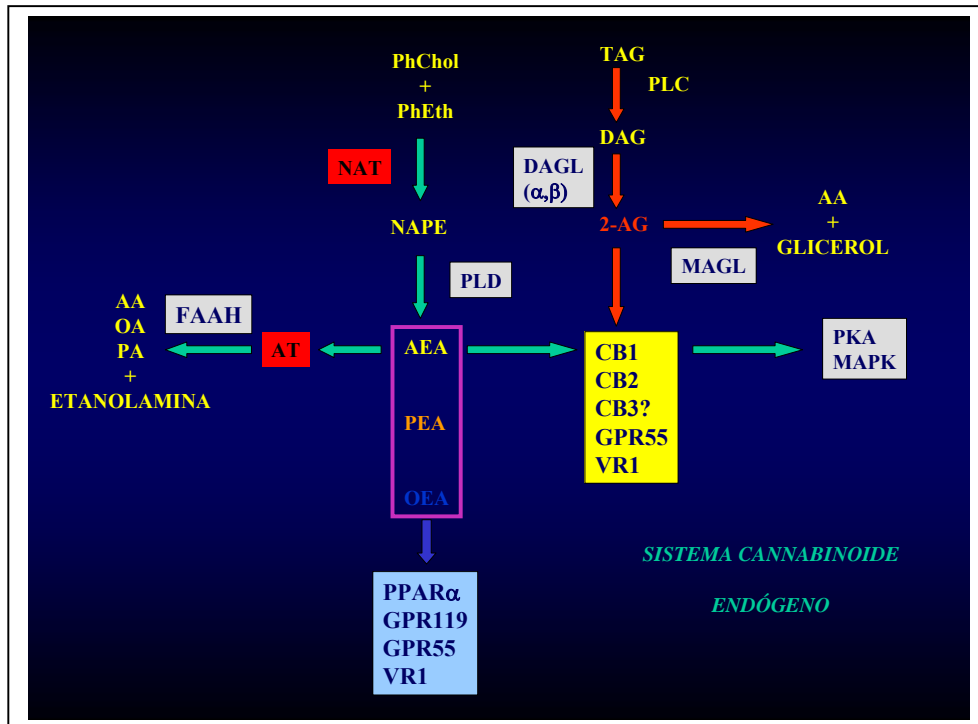


La exposición crónica a cocaína produce cambios adaptativos en el cerebro de los individuos expuestos, que podrían estar basados en cambios en la expresión de genes relacionados con los procesos de aprendizaje y memoria. Las neuroadaptaciones que estos genes alterados por la cocaína ponen en marcha podrían ser la base de los fenómenos comportamentales que caracterizan a la conducta adictiva. En la presente tesis doctoral hemos elegido los siguientes elementos de análisis:

1. Dos tipos de memoria que puede verse afectada por la administración repetida de cocaína:
  - a. la memoria procedimental que subyace a la sensibilización a la cocaína y que es de naturaleza subcortical-estriatal
  - b. la locomoción condicionada por contexto que tiene naturaleza episódica y una base hipocampal
2. Un sistema de neurotransmisión, el glutamatérgico, que controla los procesos de aprendizaje y los comportamientos motores y ejecutivos asociados a las respuestas comportamentales descritas en el apartado anterior. Se utilizará para el estudio de los cambios en expresión de genes inducidos por la cocaína.
3. Un sistema de modulación sináptica que controla la neurotransmisión glutamatérgica: el sistema endocannabinoide. Se utilizará para el estudio de los cambios en expresión de genes inducidos por la cocaína.
4. Dos modelos animales en los cuales se han generado mutaciones dirigidas a inactivar los receptores de dos moduladores adicionales de la neurotransmisión glutamatérgica: el ácido lisofosfatídico y la oleoiletanolamida.



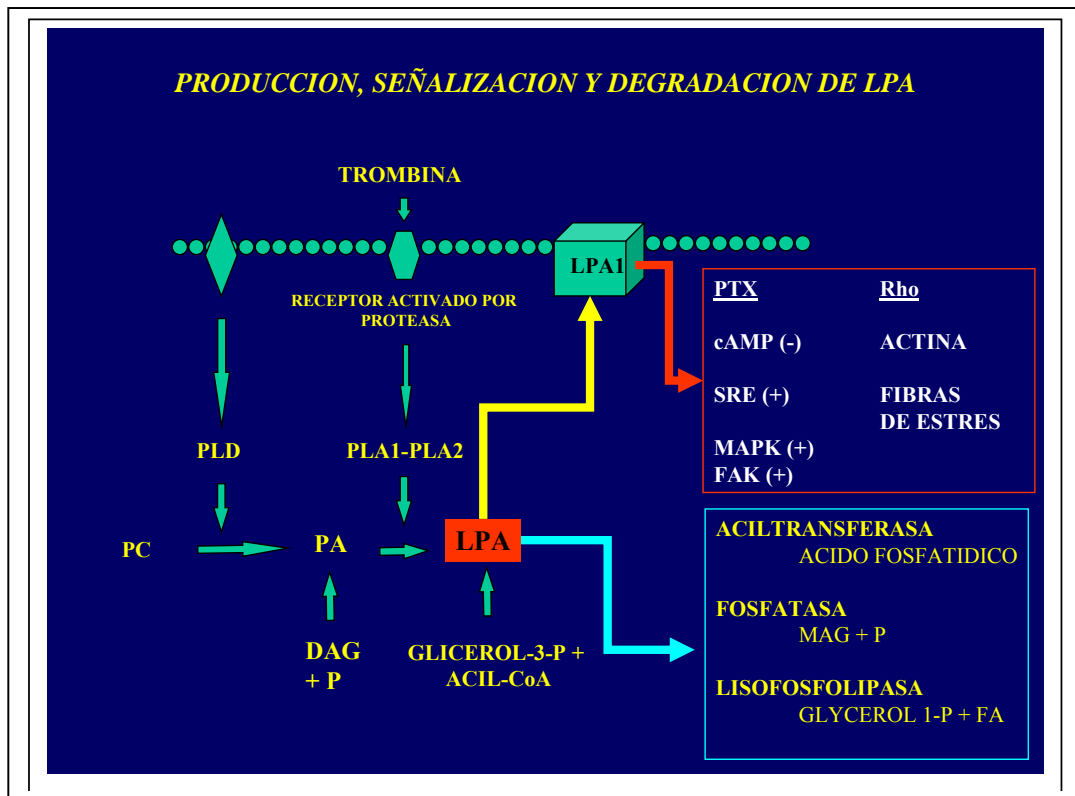
Los tres sistemas moduladores están conectados metabólicamente como puede comprobarse en los siguientes diagramas:



El sistema cannabinoide endógeno genera lípidos transmisores (anandamida, 2-araquidonil glicerol y oleiletanolamida) que pueden actuar en una serie compleja de receptores que modulan la transmisión glutamatérgica. Para este estudio se ha escogido analizar los efectos de la cocaína sobre la expresión de genes cannabinoide (estudio genómico) y por otro lado se ha estudiado el efecto de la delección del receptor de oleiletanolamida (PPAR $\alpha$ ) sobre las respuestas a cocaína. Estudios previos han caracterizado extensivamente la respuesta a cocaína de los animales carentes del receptor CB1.



El sistema endocannabinoide está emparentado con el sistema de transmisión vehiculado por el ácido lisofosfatídico:



Los dos sistemas son producto de rutas metabólicas que afectan al metabolismo de acilgliceroles y convergen en varias encrucijadas metabólicas. No se conoce apenas nada del posible papel del LPA en comportamiento y hay algunos indicios de su papel en procesos de plasticidad sináptica. Los animales carentes del receptor LPA1 serán el objeto de un estudio mixto, comportamental y genómico, en el que se evaluarán las acciones de la cocaína.



---

## **HIPOTESIS EXPERIMENTAL**

**H1.** La administración repetida de cocaína modificará la expresión de genes del sistema de neurotransmisión glutamatérgico y cannabinoide.

**H2.** La delección de los genes receptores para los mediadores de los sistemas moduladores de glutamato ácido lisofosfatídico y LPA modificará las respuestas comportamentales y genómicas a la cocaína.

Para comprobar estas hipótesis experimentales se plantean los siguientes objetivos:

## **OBJETIVOS**

1. Caracterizar las acciones de la cocaína sobre la expresión cerebral de genes de la neurotransmisión glutamatérgica en ratones de la cepa B16C57.
2. Caracterizar las acciones de la cocaína sobre la expresión cerebral de genes del sistema cannabinoide endógeno en ratones de la cepa B16C57.
3. Caracterizar las acciones comportamentales de la cocaína en ratones carentes del receptor LPA1 para ácido lisofosfatídico.



4. Caracterizar las acciones de la cocaína sobre la expresión de genes en el cerebro de ratones carentes de l receptor LPA1 para acido lisofosfatídico.
  
5. Caracterizar las acciones comportamentales de la cocaína en animales carentes del receptor para oleiletanolamida PPAR $\alpha$



**MATERIALES  
Y  
MÉTODOS**

---



Para la realización de los estudios experimentales de esta tesis, se han utilizado las instalaciones del Laboratorio de Investigación y del Laboratorio de Medicina Regenerativa, ambos pertenecientes a la Fundación IMABIS (Instituto Mediterráneo para el Avance de la Biotecnología y la Investigación Sanitaria). Además, se emplearon las instalaciones del estabulario situado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

## I. ANIMALES

En los experimentos realizados durante este estudio se han utilizado ratones macho de las cepas C57Bl/6, con un peso medio de  $25 \pm 5$  gramos, ratones macho KO para el gen del receptor del ácido lisofosfatídico, y ratones macho KO para el gen del receptor PPAR $\alpha$ ; estos animales han sido criados en el estabulario de la Universidad de Málaga.

Los animales se mantuvieron acondicionados con un fotoperíodo día/noche de 12 horas, bajo condiciones constantes de temperatura ( $20 \pm 2$  °C) y humedad ( $40 \pm 5$  % H.R.). Los animales dispusieron de comida (dieta SAFE A04, Panlab, Barcelona, España) y bebida ad libitum. Los protocolos de experimentación se llevaron a cabo de acuerdo con REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como con la directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC, que regula la investigación animal.

## II. DROGAS

Los dos compuestos utilizados durante los protocolos de sensibilización fueron:

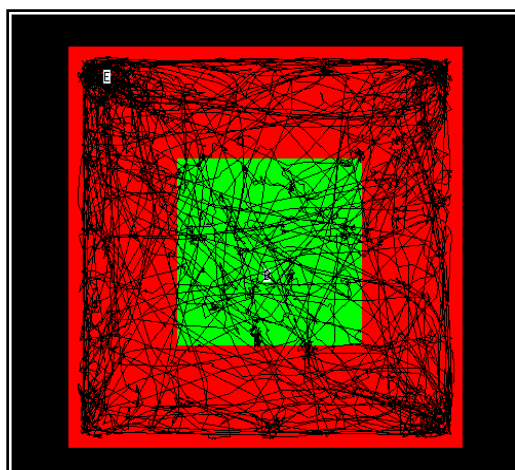
- Clorhidrato de cocaína (Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad y Consumo) diluido en suero salino (vehículo), administrado por vía subcutánea.
- Oleiletanolamida (OEA) (Tocáis Bioscience, Bristol, UK) diluido en Tween 80 al 5% en salino, y administrada por vía intraperitoneal.



### III. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

#### 1. Test del campo abierto

Para llevar a cabo los protocolos, y debido a que los ratones son de color oscuro, se utilizó un campo abierto de fondo blanco de dimensiones 50 x 50 x 50 cm. Las condiciones de iluminación en las que se lleva a cabo el desarrollo del experimento fueron determinadas a 20-25 luxes. Los animales se situaron individualmente en el centro del campo abierto después de la inyección de la droga o de salino y se registró y analizó su comportamiento mediante *videotracking* (Smart, Panlab, Barcelona) durante 30 minutos. Los resultados obtenidos se miden como distancia recorrida en centímetros, que nos sirve de índice de la actividad locomotora de los animales de experimentación.



A la izquierda vista del sistema de *videotracking* asociado al campo abierto. Arriba, ejemplo de un recorrido del animal de experimentación grabado por el sistema informático.



## 2. Protocolo curvas dosis-respuesta

Para determinar las dosis adecuadas y para observar el perfil de la respuesta a distintas dosis de cocaína en los distintos modelos animales estudiados se siguieron los siguientes protocolos:

- en el experimento con los ratones C57 se administró cocaína subcutáneamente a dosis de 0, 5, 10 y 20 mg/kg. Seguido a la inyección de la droga se ensayó el test del campo abierto durante treinta minutos.
- en el experimento para ver el efecto de la OEA sobre la acción de la cocaína administrada de forma aguda, se utilizó la dosis de 20 mg/kg de cocaína combinados con diferentes dosis de OEA (0, 1, 5 y 20 mg/kg). Las mismas dosis de OEA se administraron a ratones que solo recibieron vehículo. Después de la inyección de la combinación correspondiente se ensayó el test del campo abierto durante treinta minutos
- en el experimento con los ratones KO para el receptor LPA1, se administraron las dosis de 0, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína tanto a un grupo KO, como a un grupo *wild-type* para el receptor. A continuación de la inyección de la droga, se ensayó el test del campo abierto durante treinta minutos.

## 3. Protocolo de sensibilización

Se somete a los distintos modelos animales a un programa de cinco días consecutivos de administración de cocaína subcutánea a una dosis de 20 mg/kg. Por cada genotipo condicionado con cocaína se trata otro grupo con vehículo, de tal manera que:

- en el experimento con los ratones C57 se tienen dos grupos, uno tratado con cocaína y otro con vehículo. Cada día, después de la administración de la droga o el vehículo se ensayó el campo abierto durante treinta minutos



- en el experimento con los ratones carentes del receptor PPAR $\alpha$  tendremos cuatro grupos: los ratones KO tratados con cocaína y los tratados con vehículo, y los ratones normales tratados con cocaína y los tratados con vehículo. Cada día, después de la administración de la droga o vehículo se ensayó el campo abierto durante 30 minutos
- en el experimento para ver el efecto de la OEA sobre el condicionamiento con cocaína tendremos tres grupos experimentales: el grupo tratado con vehículo, el grupo tratado con cocaína y un último grupo tratado con cocaína más una dosis de OEA de 5mg/kg
- en el experimento con los ratones KO para el receptor LPA1, tendremos de nuevo cuatro grupos experimentales: los ratones KO tratados con cocaína y los tratados con vehículo, y los ratones normales tratados con cocaína y los tratados con vehículo. Cada día, después de la administración de la droga o vehículo se ensayó el campo abierto durante 30 minutos

Después del programa de administración de cocaína de cinco días, se dejó descansar a los distintos grupos experimentales otros cinco días sin recibir ningún tipo de droga ni pasar por el campo abierto.

Seis días después de la última administración, es decir, el día 12 desde el comienzo del programa, se ensayó con todos los grupos experimentales el campo abierto, pero esta vez todos los animales recibieron una dosis de vehículo. Con este procedimiento medimos la locomoción condicionada.

Al día siguiente medimos el efecto de la cocaína de nuevo, en este caso a una dosis de 10 mg/kg. Según el modelo animal estudiado:



- en el estudio de los C57 tendremos cuatro grupos experimentales, dos por cada grupo de condicionamiento, es decir, los animales condicionados con vehículo serán tratados o con vehículo o con cocaína 10 mg/kg, y los animales condicionados con cocaína 20 mg/kg serán tratados a su vez, con vehículo o con cocaína 10 mg/kg. Este día se ensaya de nuevo el campo abierto para medir la activación locomotora
- en el estudio de los ratones KO para PPAR $\alpha$  y para LPA1, tendremos los mismos grupos que en el caso anterior por cada genotipo
- en el estudio del efecto de la OEA sobre la sensibilización a cocaína tendremos también cuatro grupos experimentales:
  - o los animales condicionados con vehículo recibieron vehículo
  - o los animales condicionados con cocaína serán tratados o con cocaína sola o en combinación con OEA 5 mg/kg
  - o los animales condicionados con cocaína más OEA, serán tratados con cocaína.

#### IV. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Mediante PCRs (*polymerase chain reaction*) a tiempo real se llevó a cabo la cuantificación relativa de los ARN mensajeros (ARNm) de diferentes receptores y enzimas implicadas en la neurotransmisión cannabinoide, dopaminérgica y glutamatérgica.

En todo momento, las soluciones y materiales utilizados permanecían totalmente libres de ARNasas por la aplicación de protocolos específicos de manipulación y limpieza de las muestras y el área de trabajo.



## 1. Extracción del ARN total

Para el aislamiento del ARN total de las distintas zonas cerebrales se usó el método del Trizol (Gibco BRL, Life Technologies, Baltimore, Maryland) (Chomczynski, P y Socchi, N, 1987; Simas, D y cols, 1993; Maniatis, T y cols., 1998; Sewall, A y McRae, S, 1998).

Se homogeneizó entre 50-100 mg de tejido con una Ultra-Turrax (IKA Werke GmbH, Staufen, Alemania) en 1 ml de Trizol. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar grasa y el exceso de otros compuestos extracelulares. Se reservó el sobrenadante y para separar las fases se añadió 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol, agitando manualmente 15-20 segundos. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar 15 minutos, a no más de 12.000 g, a 4 °C.

Tras la centrifugación, la muestra se separó en una fase inferior (fenol-cloroformo), que contiene las proteínas, una interfase (DNA) y una fase superior acuosa, donde se encontraba exclusivamente el ARN. Transferimos esta fase a un eppendorf limpio y libre de ARNasas, cuidando de no contaminar con el DNA de la interfase.

Para precipitar el ARN, se añadió a la fase acuosa ya transferida, 500 µl de isopropanol por mililitro de Trizol. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a centrifugar 10 minutos a 12.000 g y a 4 °C.

Se elimina el sobrenadante y se lava el ARN precipitado con 1 mL de etanol al 75%. Se agitó en vórtex hasta que se desprendió el *pellet*, para después centrifugar de nuevo a 7.500 g durante 5 minutos a 4 °C.

Se elimina nuevamente el sobrenadante y se deja secar bien hasta que todo el etanol se evapore (10-20 minutos). Para rehidratar y disolver el pellet de ARN se añadieron 100 µl de agua libre de ARNasas.



## 2. Purificación

Con objeto de tener una preparación pura de ARN para la qPCR se realizó una la limpieza del ARN utilizando el RNeasy Mini Kit de Qiagen, que contiene unas columnas con una membrana de sílica-gel que permite purificar hasta 100 µg de ARN (elimina selectivamente la mayoría de las moléculas menores de 200 nucleótidos, como el 5.8S ARNr, 5S ARNr y ARNt, que suponen entre un 15-20% del ARN total). Con esta técnica se eliminó también la mayor parte del ADN, pero para asegurarnos de su total eliminación se incluyó un paso de digestión en columna con ADNasa I (RNase-free DNase Set, Qiagen).

## 3. Cuantificación

Una vez aislado y purificado, el ARN se midió su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Biotech Photometer, UV 1101, WPA). Para ello, de partida se hizo una dilución 1/80 en agua libre de RNAsas para cuantificar y en Tris-EDTA pH 7.3, para comprobar la pureza. En todos los casos, la absorbancia a 260 nm se ajustó a 0.1-1 para que la cuantificación fuera fiable y el ratio A260 (cuantifica ARN)/ A280 (cuantifica proteínas) se comprobó que estuviera entre 1.8 y 2.

Para comprobar la integridad del ARN extraído, se pusieron las muestras en un gel de agarosa al 2% en TBE 1x (Sigma). Como tampón de carga se utilizó glicerol al 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0,4% y bromuro de etidio al 4%. En cada pocillo se cargó 0,5 µg de ARN en 2 µl de tampón de carga. En estas condiciones, los ARNr 28S y 18S debían estar en proporción 2:1, indicando que no hay degradación significativa de la muestra.

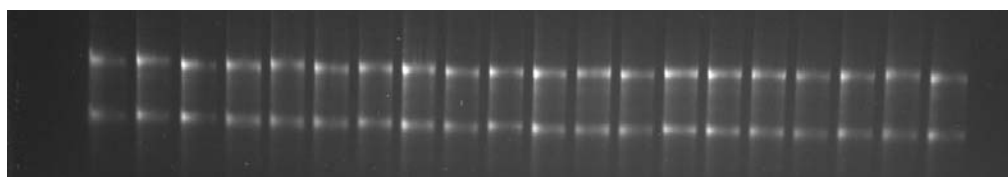


Imagen de un gel de ARN. La banda superior se corresponde con el ARNr 28S y la inferior con el ARNr 18S.



#### 4. Transcripción reversa (RT)

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó en un termociclador (mastercycler gradient, eppendorf). Este paso de ARN a ADNc se hizo en dos fases:

A. Para cada muestra se tomó:

- un volumen de ARN que contenía 2 µg ajustando el volumen a 26 µl con agua libre de RNasas
- 2 µl *random primer* (oligonucleótidos de secuencia azarosa) (Roche)

Esta mezcla se puso en el termociclador con el siguiente programa de temperaturas:

1. 70°C	10 minutos
2. 4°C	5 minutos
3. Hold	4 °C ∞

B. Para la transcripción reversa se usó la enzima M-MuLV reverse transcriptase (Roche Applied Science, Indianápolis, USA). Se preparó una mezcla en la que se añadió por cada muestra:

- 8 µl de tampón de reacción 5x
- 2 µl dNTP (10 mM) (Roche)
- 0.5 µl (20 U) de inhibidor de las RNasas (Roche)
- 2 µl (40 U) M-MuLV 500 U



Se añadió 12.5 µl de esta mezcla y se puso el siguiente programa de temperaturas:

1. 25 °C      10 minutos
2. 42 °C      60 minutos
3. 70 °C      30 minutos
4. Hold      4 °C ∞

Se incluyeron controles negativos en las reacciones de RT eliminando la enzima M-MuLV. Una vez terminado, se guardó el ADNc a -20 °C, listo ya para realizar las qPCRs.

## **5. PCRs cuantitativa a tiempo real.**

La reacción en cadena de la polimerasa se debe a Kary B. Mullis (1989), que ideó esta técnica gracias a la cual fue posible amplificar fragmentos específicos de ADN.

Con los años esta técnica se ha perfeccionado y hoy en día podemos hablar de PCR cuantitativa a tiempo real, la cuantificación del producto amplificado se realiza a medida que se va sintetizando. Esta tecnología se basa en el uso de fluoróforos que permiten detectar la fluorescencia emitida y monitorizar en tiempo real lo que está ocurriendo en cada ciclo de amplificación.

La cuantificación se puede hacer, dependiendo del tipo de estudio que se esté llevando a cabo, de forma absoluta (concentración del producto) o relativa (porcentaje respecto a un patrón de referencia).

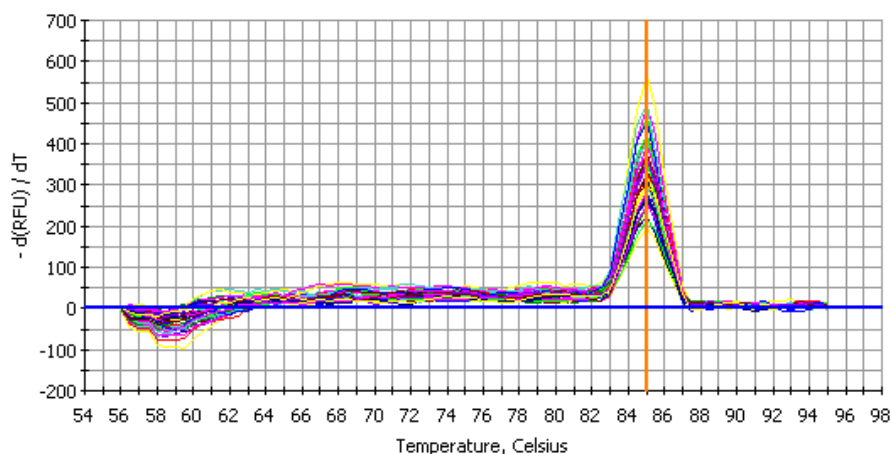
Para las PCRs cuantitativas a tiempo real se utilizó el iCycler (Biorad) y como sistema de marcado fluorescente el Quantitec SYBR Green I PCR kit (Qiagen, Hilden, Alemania).



El SYBR Green I puede unirse a la doble hélice de ADN y emite una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN (SYBR Green absorbe a una longitud de onda de 497 nm y emite a 520 nm).

Una vez desnaturalizado el ADN y, tras la unión del cebador o primer, las moléculas de SYBR Green se van uniendo a la doble cadena y emite fluorescencia, de forma que si la reacción es monitorizada continuamente se puede ver como va aumentando la fluorescencia. La fluorescencia que emite el SYBR no unido se usa como *background*.

Puede ocurrir que amplifiquen productos inespecíficos porque se han formado dímeros de primers. Para diferenciarlos de los productos de amplificación es conveniente hacer al final de la amplificación una curva de fusión (los productos de PCR se someten a un nuevo ciclo de desnaturalización de 60 a 95 °C, obteniéndose la gráfica de la variación de la fluorescencia en función del tiempo). Si no ha habido formación de dímeros de primers, aparecerá un solo pico, indicando que se trata de un solo producto específico de amplificación.

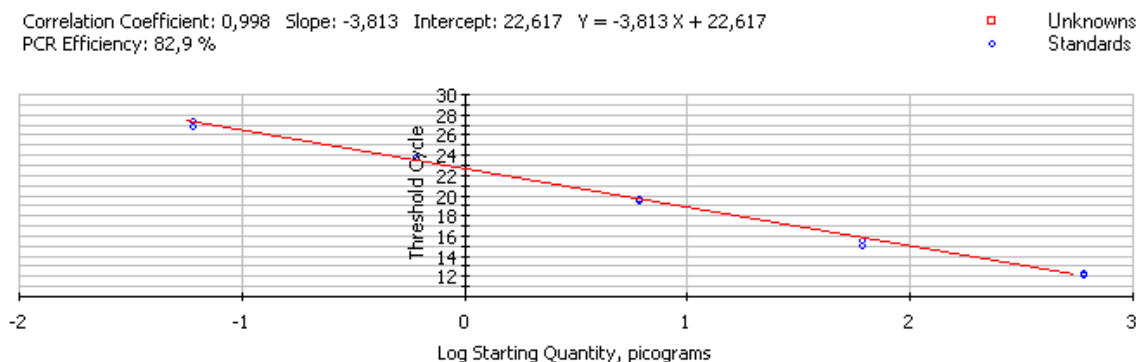


Para hacer la cuantificación se realizó una amplificación simultánea de estándares con diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, de modo que la



amplificación de las muestras debe estar entre las de los estándares. Cuanto más próximo este el valor de la pendiente a -3.323, mayor será la eficiencia de la reacción:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$



Mediante el uso de la PCR cuantitativa a tiempo real se midió la expresión de una serie de genes (ver **Tabla 1**) en las diferentes áreas cerebrales de los animales tratados, relacionados con el sistema cannabinoide, sistema dopaminérgico y sistema glutamatérgico.

Para determinar los niveles relativos de ARNm de cada uno de los genes estudiados, se compararon con Beta-Actina, gen de expresión constitutiva, utilizado como referencia estándar.

Para cada enzima o receptor se utilizó una pareja de cebadores (oligonucleótidos sintéticos de unos 20 nucleótidos de longitud) complementarios a los extremos de la región que se quería amplificar. Los cebadores para las PCRs fueron diseñados a partir de las secuencias de los genes de ratón localizados en la base de datos NCBI.

Para el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- la longitud de cada uno de los cebadores debía ser en torno a 20 bases, tamaño ideal para establecer una especificidad y rendimiento adecuados
- la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de cada cebador de la misma pareja debía ser lo más parecida posible



- el contenido de G + C (guanina más citosina) debía ser del 50% aproximadamente (40-60)
- no debían existir secuencias complementarias dentro de cada pareja de cebadores, para evitar su dimerización.

Los oligonucleótidos fueron proporcionadas por Proligo (Proligo France SAS, Paris, France).

La cuantificación fue llevada a cabo en base a las curvas estándar realizadas al mismo tiempo que las muestras. Los estándares fueron obtenidos mediante una amplificación por PCR a partir de muestras controles. El programa de temperaturas utilizado para las PCRs fue el mismo para todos, salvo en lo que respecta a la temperatura de hibridación, que era específica de cada pareja de cebadores (**Tabla 2**).

Los productos de cada PCR se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2% para poder comprobar el tamaño del fragmento y la ausencia de otros fragmentos contaminantes. Se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y se hicieron diluciones seriadas 1/10. Estas diluciones fueron probadas en el iCycler y se eligieron aquellas diluciones que estaban por encima y por debajo de la concentración esperada de las muestras, para formar la curva estándar.

La reacción de PCR se preparó para cada muestra el siguiente volumen:

<i><u>Componentes</u></i>	<i><u>Volumen (µl)</u></i>
<i>Agua grado PCR</i>	4.86
<i>Primer sentido</i>	0.32
<i>Primer antisentido</i>	0.32
<i>Master SYBR Green</i>	8
<i>cDNA</i>	2.5

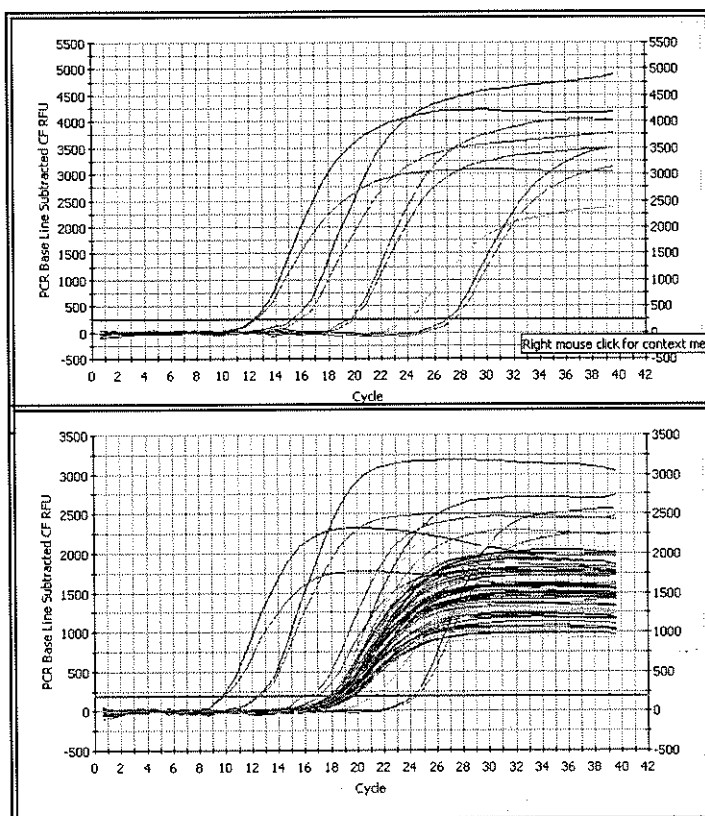


Nombre	Oligo sentido 5' → 3'	Oligo antisentido 5' → 3'	Número de acceso GenBank	Tamaño fragmento amplificado (pb)
<i>b-actina</i>	<i>tacagcttcaccaccacagc</i>	<i>aaggaaggctggaagagagc</i>	NM_007393	206
CB1	<i>gctgcaatctgtttgctcag</i>	<i>ttgcatcttctgaggtgtg</i>	NM_007726.1	201
FAAH	<i>cggagagtgactgtgtggtg</i>	<i>tcagtcctaaccagagg</i>	NM_010173.2	220
NAPE- PLD	<i>gcgccaagctatcagtatcc</i>	<i>tcagccatctgagcacattc</i>	AB_112350	223
MAGL	<i>catggagctgggaaactg</i>	<i>ggagatggcaccgccatgga</i> <i>g</i>	NM_011844.3	240
DAGLa	<i>agaatgtcacctcggaatg</i>	<i>gcaggttgtaagtccgaaa</i>	NM_198114.1	153
DAGLβ	<i>aagcggccagatacattcac</i>	<i>ggataagcgacacgacaaaag</i>	NM_144915.2	246
D1	<i>ttctctttcgcacccctcac</i>	<i>atgaccaagacagccaccaa</i>	NM_010076.1	176
DAT	<i>accgcgtgctgagtattttg</i>	<i>tacatagggcatggtagctgtg</i>	AF_109391	193
TH	<i>ccaaggaaagtgtcagagttg</i> <i>g</i>	<i>accctgctgtattggaagg</i>	NM_009377.1	150
NR1	<i>gtgcaagtggcatctacaa</i>	<i>tgggcttgacatacacgaag</i>	NM_008169	157
NR2A	<i>gtttgttggtgacggtgaga</i>	<i>aagaggtgctccagatgaa</i>	NM_008170	180
NR2B	<i>atgtggattgggaggatagg</i>	<i>tcgggctttgaggatacttg</i>	NM_008171	249
NR2C	<i>ggaatggtatgatcggtgag</i>	<i>ccgtgaggcacattacaaac</i>	NM_010350	225
<i>mGluR5</i>	<i>aagaaggagaacccaaccca</i>	<i>ttcggagactggagagtttg</i>	BC096533.1	179
<i>GluR1</i>	<i>tttctaggtgcggttgtgg</i>	<i>cctttggagaactgggaaca</i>	NM_008165.2	210
<i>GluR2</i>	<i>aaggaggaaagggaacga</i> <i>g</i>	<i>ccgaagtggaaaactgaacc</i>	NM_001039195.1	217
<i>GluR3</i>	<i>caacaccaaccagaacacca</i>	<i>atcgcatcagtgggaaa</i>	NM_016886.2	229



TEMPERATURA	TIEMPO
1) 95 °C	15 minutos
2) 94 °C	15 segundos
3) T° específica de cada pareja de cebadores	30 segundos
4) 72 °C	30 segundos
5) Ir a 2, 44 veces más	
6) 72 °C	10 minutos
7) Melting curve cada 0.5 °C, de 56-95 °C	10 segundos
8) 4 °C	infinito

Tabla 2. Programa de temperaturas para la PCR.



Selección de las diluciones para las curvas estándar. La concentración de las muestras están entre los cinco estándares.



Cada reacción fue realizada por duplicado en un volumen final de reacción de 15  $\mu$ l.

Los parámetros establecidos en cada ciclo fueron los siguientes:

- 95 °C durante 15 minutos para activar a la ADN polimerasa,
- 30-40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos,
- temperatura de hibridación específica para cada gen, durante 30 segundos
- paso final de extensión a 72 °C durante 30 segundos en el que la fluorescencia es adquirida
- análisis de las curvas de fusión para asegurar que únicamente ha amplificado un solo producto.

Una vez obtenidos los valores absolutos para cada gen y de cada muestra, se calculó la proporción entre cada gen analizado y el gen constitutivo ( $\beta$ -actina).

## V. INMUNODETECCIÓN (WESTERN-BLOTTING)

Esta técnica se utiliza para identificar y localizar determinadas proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos.

### 1. Preparación de membranas

Para los *western blotting* del sistema cannabinoide se emplearon homogeneizados de membranas de las 4 zonas a estudiar del cerebro de los ratones con los distintos tratamientos: estriado, hipocampo, cerebelo y corteza prefrontal. Para la obtención de estos homogeneizados se procedió del siguiente modo:

Las regiones cerebrales de ratón fueron diseccionadas, pesadas y almacenadas individualmente en eppendorf, para congelarlos a -80 °C hasta su uso.



A cada muestra se le añadió en su tubo diez veces su peso en volumen (10 mL/g) de tampón HEPES (de ácido N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico, Sigma-Aldrich Co.) 50 mM a pH 8 con sacarosa 0.32 M. Las muestras siempre se mantienen en hielo.

El siguiente paso fue homogeneizar las muestras y centrifugarlas a 800 g durante 10 minutos a 4 °C (que permite la precipitación de núcleos, agregados no homogeneizados y ADN). El sobrenadante se pasó a tubos de ultracentrifugación, y se centrifugó a 40.000 g durante 30 minutos, a 4 °C. En esta ocasión se descartó el sobrenadante (fracción soluble), y el precipitado se resuspendió al añadirse ¼ del volumen inicial (volumen diez veces mayor a su peso) pero esta vez con tampón HEPES 50 mM a pH 8 sin sacarosa.

Finalmente las muestras se resuspendieron con pipetas de vidrio pasteur y los homogeneizados cerebrales de membrana fueron repartidos y almacenados en alícuotas de 25 µg.

## 2. Cuantificación de proteínas totales

Para la determinación de proteínas se prepararon distintas diluciones de la proteína utilizada como estándar, albúmina de suero bovino, entre 25 y 2000 µg/ml y con ellas tendremos una curva patrón para cada vez que realicemos el ensayo:

1. Se añaden 5 µl de las diluciones apropiadas de los estándares y de las muestras directamente sobre la microplaca de 96 pocillos. Como blanco se utilizó el tampón donde se encontraba diluida la muestra.
2. A continuación se añaden 250 µl del reactivo azul de Coomassie (PIERCE, Biotechnology, INC, IL, USA). Agitar durante 30 segundos.
3. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y seguido, medir la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro (VERSAmix, *microplate*



*reader*, MDS Inc, Toronto, Canadá), restando la absorbancia medida para el blanco.

4. Representar la densidad óptica ( $DO_{595}$ ) frente a la concentración de los estándares, para obtener la curva patrón. Extrapolando los valores de  $DO_{595}$  de la muestra problema en la recta patrón, se obtiene la concentración de proteínas.

### 3. Inmunodetección (western-blot).

La inmunodetección de proteínas fue introducida como una combinación de dos de las técnicas analíticas más importantes en los últimos 30 años; la electroforesis en gel y el inmunoensayo. El método combina la capacidad analítica de la electroforesis con la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1979 por varios grupos, y especialmente por H. Towbin y cols. (1979).

Llevamos a cabo el análisis de western blot para los componentes del sistema endocannabinoide (FAAH, CB1, MAGL, NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , DAGL $\beta$ ) y  $\beta$ -actina, como constitutivo. Utilizamos entre 25 y 50  $\mu$ g de proteína. Las proteínas de interés se separaron en función del peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (el porcentaje de acrilamida depende del tamaño de la proteína que se quiere estudiar) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Tras la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas. La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, en este caso de nitrocelulosa.

La ventaja de este proceso es su corta duración (de 30 min a pocas horas), lo que reduce notablemente el efecto de difusión de las bandas. El procedimiento se inicia apilando sucesivamente una esponja plana, papel de filtro empapado en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% v/v metanol, pH 8.3), el gel, la membrana en



contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en un tanque en el que se encuentra el tampón de transferencia y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). La carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es positiva debida a la carga del SDS.

La electroforesis se realiza a 90 voltios durante 2-3 h. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución por lo que se refrigera el sistema. Una vez realizada la transferencia la membrana se puede analizar inmediatamente o bien conservarla en frío (2 a 8°C) durante meses.

Una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es el bloqueo, para prevenir la unión no específica del sistema de detección a la membrana, con el riesgo asociado de tener un elevado 'background' o falsos positivos. En este caso, las membranas se bloquearon durante 1 hora con BSA (3% BSA, 0.02% azida sódica, en PBS).

A continuación se procedió a la incubación durante toda la noche con el primer anticuerpo específico contra las proteínas del sistema endocannabinoide que se querían estudiar (ver **Tabla 3**) diluidos en PBS más 0.1% (v/v) de Tween 20 (PBST, tampón de incubación y lavado). Después de 3 lavados de 5 minutos en PBST, se incubó 1 hora a 25 °C con el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (Sigma) en PBS. Finalmente, se volvió a lavar tal como se ha descrito previamente y se revelaron las bandas que contenían las proteínas de interés utilizando un kit de luminol (Santa Cruz Biotechnology). Se cuantificaron las distintas bandas por densitometría.



<i>Nombre</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Dilución utilizada</i>
<i>b-actina</i>	<i>Sigma</i>	<i>1:1000</i>
<i>CB1</i>	<i>Cayman</i>	<i>1:200</i>
<i>FAAH</i>	<i>Cayman</i>	<i>1:100</i>
<i>NAPE-PLD</i>	<i>Sintetizado en nuestro laboratorio</i>	<i>1:100</i>
<i>MAGL</i>	<i>Cayman</i>	<i>1:200</i>
<i>DAGL<math>\alpha</math></i>	<i>Sintetizado en nuestro laboratorio</i>	<i>1:100</i>
<i>DAGL<math>\beta</math></i>	<i>Sintetizado en nuestro laboratorio</i>	<i>1:100</i>

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para la cuantificación de proteínas del sistema cannabinoide.

## VI. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se evaluó la presencia del receptor PPAR $\alpha$  en el sistema dopaminérgico cerebral de ratón mediante inmunohistoquímica.

Se utilizaron ratones CD1 adultos, que fueron anestesiados con Tribromoetanol 300 mg/kg (Fluka Chemika AG, Buchs, Swizerland), perfundidos transcárdialmente con tampón fosfato salino 0,1 M (PBS; pH 7.4) seguido de paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 15 minutos. Los cerebros fueron diseccionados, y post-fijados toda la noche en paraformaldehído a 4°C, equilibrado con sacarosa al 30% en PBS a 4°C, congelado y cortado en secciones transversales de 30  $\mu$ m de grosor mediante un microtomo de congelación (Leyca Microsystems GmbH, Alemania).

Después de varios lavados, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal (ratón) anti-tirosina hidroxilasa (Sigma; T2928), diluido 1:500, y con un anticuerpo policlonal (conejo) anti-PPAR $\alpha$  (Fitzgerald, RDI-PPARAabrx), diluido 1:500, toda la noche a temperatura ambiente. Después de largos lavados en PBS, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG-FITC (Sigma; F2012) diluido



1:200, y un anticuerpo secundario anti-conejo IgG-Cy3 (Jackson; 711-166-152) diluido 1:300, durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron lavadas en PBS y analizadas en un microscopio de epifluorescencia.

Las fotografías digitales fueron tomadas con un microscopio Olympus BX41 acoplado a una cámara digital Olympus DP70. El brillo y contraste de las imágenes digitales fueron ajustados con el programa Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, CA), y las figuras fueron montadas y marcadas utilizando el Adobe PageMarker.

## VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados en todos los ensayos se presentan como la Media  $\pm$  SEM (*Standard Error of the Mean*) de al menos diez determinaciones por grupo experimental. Todos los datos han sido analizados con los programas estadísticos SPSS 11.5 para Windows (Lead Technologies) y GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

La significatividad estadística de los datos de comportamiento fue valorada aplicando el test del ANOVA de una vía, y el test pos Hoc de Tukey. La significatividad estadística de los resultados de las cuantificaciones génicas y proteicas fue analizada mediante un ANOVA de dos vías, con el test pos Hoc de Bonferroni.

En todos los casos, se ha considerado una diferencia estadísticamente significativa a partir de las probabilidades: (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  y (\*\*\*)  $p < 0.001$  de las comparaciones.



**RESULTADOS**

---



## I. ACCIONES DE LA COCAÍNA EN RATONES BI6C57

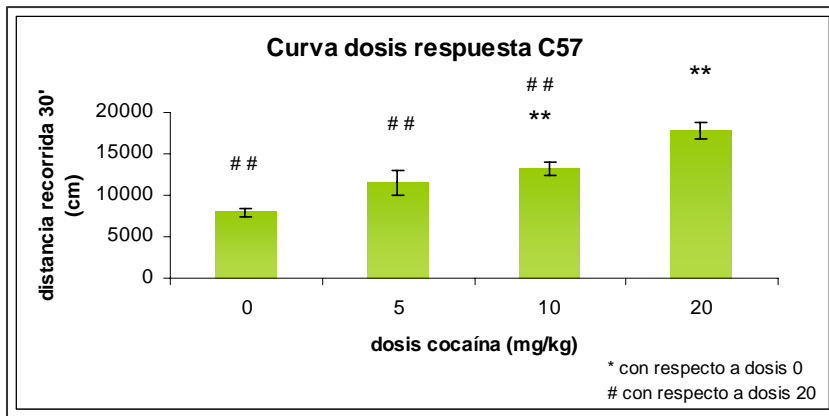
### 1. RESULTADOS COMPORTAMENTALES

La adicción a drogas incluye complejos procesos comportamentales, y parece estar relacionada con el fenómeno de sensibilización, fenómeno opuesto a la tolerancia. Consiste en el aumento de algunos efectos producto de la administración crónica con cocaína. Dado que la sensibilización es un fenómeno que permanece por muchos años (tal vez sea irreversible), se ha utilizado como paradigma de las neuroadaptaciones inducidas por la exposición crónica a drogas y por tanto como elemento fenotípico de la adicción. Además, un lado interesante de la sensibilización es la locomoción condicionada, es decir, la inducción de respuestas contextuales asociadas a la administración de cocaína y que se manifiestan como un incremento en la actividad locomotora del animal al ubicarlo en un espacio/ambiente asociado a la administración de cocaína.

En este conjunto de experimentos mostraremos como aparece la sensibilización a cocaína en ratones de la cepa C57.

#### **Curva dosis-respuesta a cocaína.**

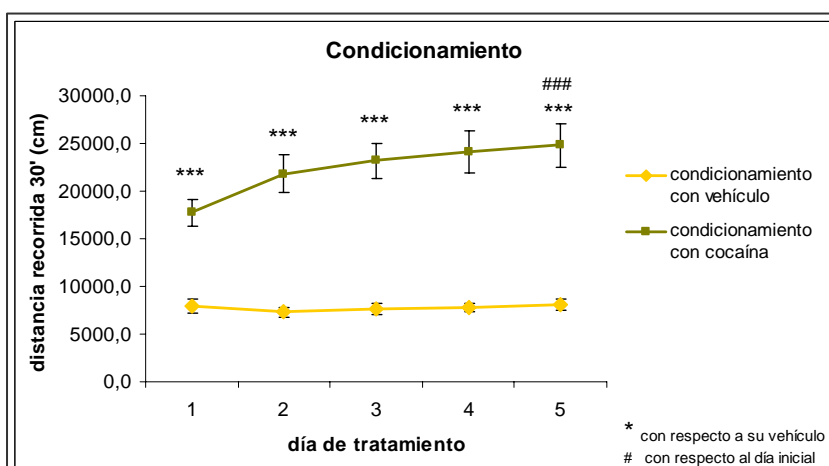
En un primer paso, se probaron tres dosis distintas de cocaína (5, 10 y 20 mg/kg) administrada subcutáneamente. Después de cada administración se ensayó el campo abierto durante treinta minutos. La distancia recorrida durante ese tiempo es indicativa de la activación locomotora inducida por la cocaína; los resultados se pueden ver en la **figura 1**. Con el aumento de la dosis de la droga se aprecia un incremento en la locomoción, alcanzando el máximo con la dosis de 20 mg/kg. Utilizaremos esta dosis para los experimentos de sensibilización, por ser la que provoca una mayor activación locomotora.



**Figura 1.** Curva dosis-respuesta a cocaína en ratones de la cepa C57. Se ensayan las dosis de 0, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína, y se mide la distancia recorrida en campo abierto durante 30 minutos. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

### Condicionamiento con cocaína.

Se somete a los animales de experimentación a un programa de cinco días consecutivos en los que reciben cocaína subcutánea (20 mg/kg) o vehículo. Después de cada administración se midió la distancia recorrida, durante treinta minutos, en el campo abierto. El resultado (ver **figura 2**), es un aumento de la actividad locomotora en los animales tratados con cocaína con respecto a los animales tratados con vehículo. Además, se puede observar como el grupo tratado con cocaína aumenta su respuesta a lo largo del programa de administración, apareciendo diferencias significativas entre la activación locomotora del primer y último día, es decir, hay una sensibilización de la activación locomotora inducida por cocaína.

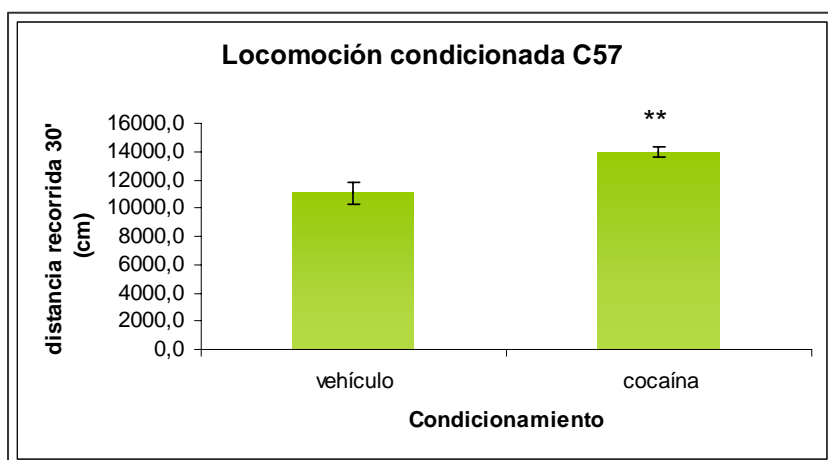


**Figura 2.** Efecto de la cocaína (20 mg/kg) sobre la distancia recorrida en ratones de la cepa C57, durante cinco días consecutivos. Se compara el efecto de la cocaína con respecto al vehículo en el mismo día, y el efecto de la cocaína el primer y último día. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).



### Locomoción condicionada inducida por cocaína.

Cinco días después de la última administración de cocaína se sometió a los animales al test del campo abierto, pero en este caso, todos los animales recibieron como tratamiento vehículo. Como resultado (ver **figura 3**), los animales que habían sido condicionados durante los primeros cinco días con cocaína, muestran un aumento significativo de la distancia recorrida durante los treinta minutos del test, con respecto a los animales que habían sido condicionados con vehículo. Es decir, los animales que recibieron un tratamiento crónico con cocaína muestran una respuesta similar a la que hubieran mostrado de haber recibido una dosis de cocaína. Es importante recordar que esta respuesta es un condicionamiento contextual que supone el reconocer un espacio (contexto) asociado a la cocaína, y por tanto supone la participación de circuitos de memoria explícita de base hipocampal.



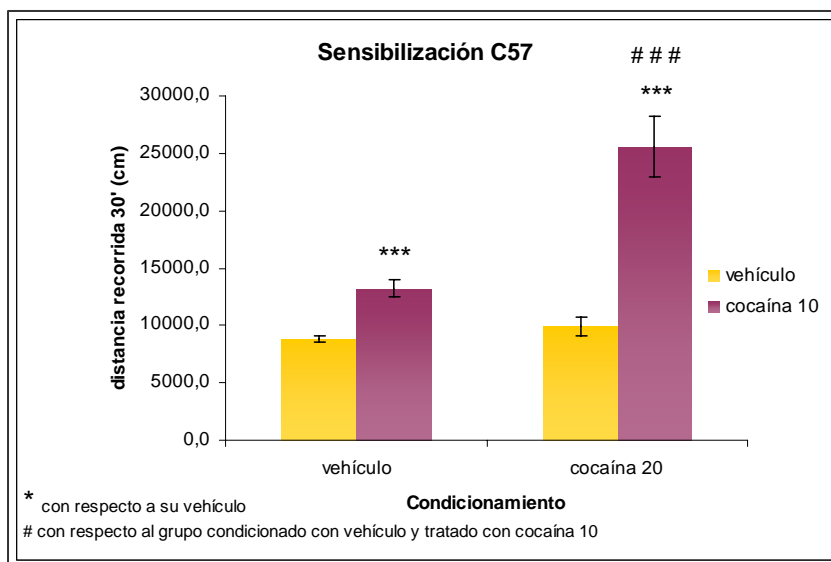
**Figura 3.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones de la cepa C57 cuando se ensaya de nuevo el campo abierto cinco días después de la última inyección, y tratando a los dos grupos con vehículo. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

### Sensibilización locomotora inducida por cocaína.

De nuevo, ensayamos con los ratones de la cepa C57 utilizados en el experimento anterior. Al día siguiente de ensayar la locomoción condicionada, es decir, seis días después de la última inyección de cocaína, se vuelve a someter a los ratones al campo abierto durante treinta minutos, pero en este caso a cada grupo de condicionamiento se le administrará



vehículo o cocaína, y a una dosis de 10 mg/kg. De tal manera que tendremos cuatro grupos experimentales: los animales condicionados con vehículo y tratados de nuevo con vehículo; los animales condicionados con vehículo y tratados con cocaína; los animales condicionados con cocaína y tratados con vehículo, y los animales condicionados con cocaína (20 mg/kg) y que vuelven a recibir cocaína (10 mg/kg). Los resultados obtenidos (ver **figura 4**) revelan un aumento de la actividad locomotora en los dos grupos que recibieron la dosis de 10 mg/kg de cocaína, con respecto a sus grupos vehículo. Además, este aumento es significativamente mayor en los ratones que habían sido condicionados previamente con cocaína, que en los ratones que reciben por primera vez una dosis de cocaína. Queda establecida una sensibilización comportamental en estos ratones, que nos servirán como modelo de adicción para el estudio de genómica, y así identificar los cambios adaptativos asociados a la inducción de sensibilización.



**Figura 4.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones de la cepa C57 cuando se ensaya de nuevo el campo abierto seis días después de la última inyección, y tratando, en este caso, a un grupo con vehículo y a otro con cocaína a una dosis de 10 mg/kg. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).



## 2. RESULTADOS DE GENÓMICA

En este primer conjunto de experimentos se muestran los efectos de los diferentes patrones de administración de cocaína, sobre la expresión génica y en algún caso proteica, de los diferentes componentes de los sistemas de neurotransmisión elegidos. Este estudio se ha realizado en un modelo animal como es el ratón de la cepa Bl6C57. Estos elementos se estudiaron en diferentes regiones cerebrales relacionadas con el sistema de recompensa. Se analizarán los efectos de:

- a. Del vehículo
- b. De la cocaína administrada de forma aguda (10 mg/kg)
- c. Del tratamiento crónico con cocaína (20 mg/kg) durante cinco días, seguido de un período de descanso de 6 días
- d. Del efecto de una administración aguda de cocaína (10 mg/kg) después del tratamiento de cinco días con cocaína (20 mg/kg), seguido de 6 días de descanso

Los sistemas de neurotransmisión seleccionados serán el sistema dopaminérgico, el sistema glutamatérgico y el sistema endocannabinoide.

### 2.1. Sistema dopaminérgico

Como hemos visto en la introducción, el mecanismo de acción de los psicoestimulantes afecta directamente a los terminales dopaminérgicos mesotelencefálicos. Hay gran número de estudios que demuestran que la dopamina contribuye, al menos en parte, en los efectos de refuerzo de muchas drogas de abuso a través de sus proyecciones mesolímbicas (a núcleo acumbens) y mesocorticales (a corteza prefrontal).



También, hay evidencias fisiológicas y farmacológicas de que la transmisión dopaminérgica mesolímbica y nigroestriatal son cruciales en la expresión de la sensibilización comportamental a cocaína. Sin embargo, los efectos de la exposición a cocaína sobre el sistema de neurotransmisión dopaminérgico no están claros en la literatura, y parecen ser debido a los distintos regímenes de dosis, vías de administración, etc.

En este apartado veremos como afectan diferentes patrones de administración a la expresión génica de los distintos componentes del sistema dopaminérgico. A su vez el estudio se hizo en tres zonas distintas del circuito de recompensa: estriado, hipocampo y corteza prefrontal. El estudio se repitió en una cuarta zona utilizada como control negativo: el cerebelo, una zona que no forma parte, al menos directamente, del sistema de recompensa, pero que sí está relacionada con el control de la locomoción y en el que existe una importante transmisión noradrenérgica que es sensible a las acciones de la cocaína.

### **2.1.1. Estriado**

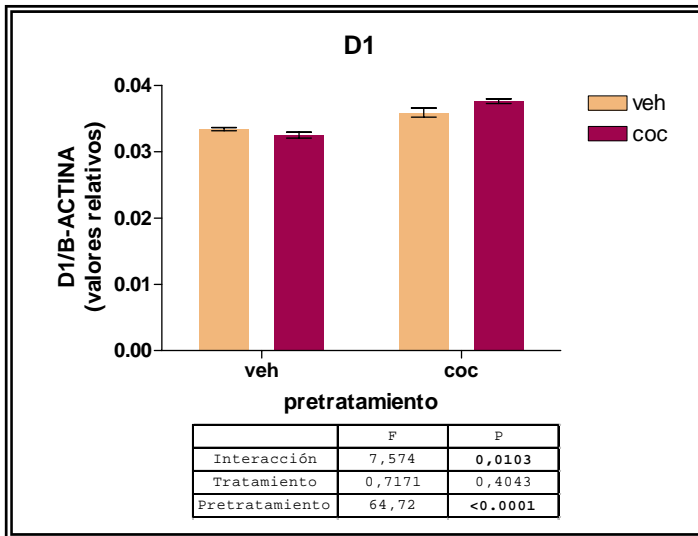
#### **2.1.1.1. Receptor**

La transmisión dopaminérgica está mediada por receptores de membrana específicos de tipo metabotrópico. En el SNC de vertebrados se encuentran cinco subtipos de este receptor, pero es el subtipo D1 el que presentando una alta densidad sobre las neuronas estriatales se ha vinculado a las acciones de la cocaína. Este receptor está implicado en la sensibilización comportamental a cocaína ya que los antagonistas del receptor D1 atenúan la expresión de la sensibilización, y esta se afecta en los animales carentes de receptor D1

En este caso, el ANOVA de dos vías muestra una interacción significativa entre los factores pretratamiento y tratamiento, además de un efecto significativo del pretratamiento para los niveles de ARNm del receptor D1 en el estriado (**ver figura 5**). Esto quiere decir que el nivel de ARNm del receptor D1 varía dependiendo de si ha habido previamente una



exposición crónica a cocaína o no. En el caso de haber habido un pretratamiento con cocaína hay un aumento significativo de la expresión génica del receptor de dopamina D1. Sin embargo, la exposición aguda a cocaína no varía per se el receptor D1.



**Figura 5.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor de dopamina D1 en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

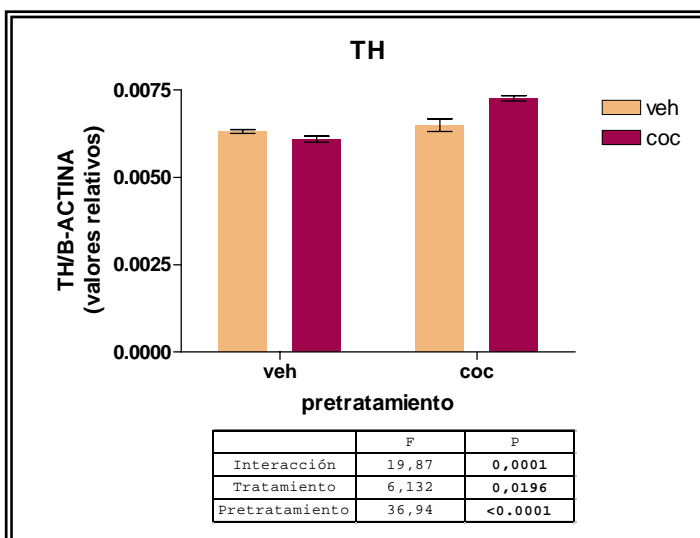
#### 2.1.1.2. Síntesis

Es conocido que la cocaína produce un aumento de la dopamina en las áreas relacionadas con la recompensa, lo que podría ser debido a cambios en la expresión génica de la enzima de síntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa. Para ver como varía en nuestro estudio medimos los niveles de expresión de ARNm de esta enzima por PCR a tiempo real (**ver figura 6**).

El ANOVA de dos vías muestra cambios significativos debidos al pretratamiento que hayan recibido los animales, al tratamiento agudo y además una interacción significativa entre las dos variables. Es decir, el efecto de la exposición aguda a la droga varía dependiendo de si ha habido un pretratamiento previo con cocaína o no. De manera que en el caso de la exposición aguda a cocaína en animales con un pretratamiento con vehículo, los niveles de ARNm de la TH disminuyen con la cocaína de manera significativa. Sin embargo en el caso de que haya habido una administración crónica de cocaína antes de la



exposición aguda a la droga, los niveles de ARNm de la TH aumentan, lo que indica una potenciación de la síntesis de dopamina. Además, también podemos decir que el pretratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles basales de expresión de la enzima de síntesis de la dopamina (efecto general del tratamiento).



**Figura 6.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de la enzima de síntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa, en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

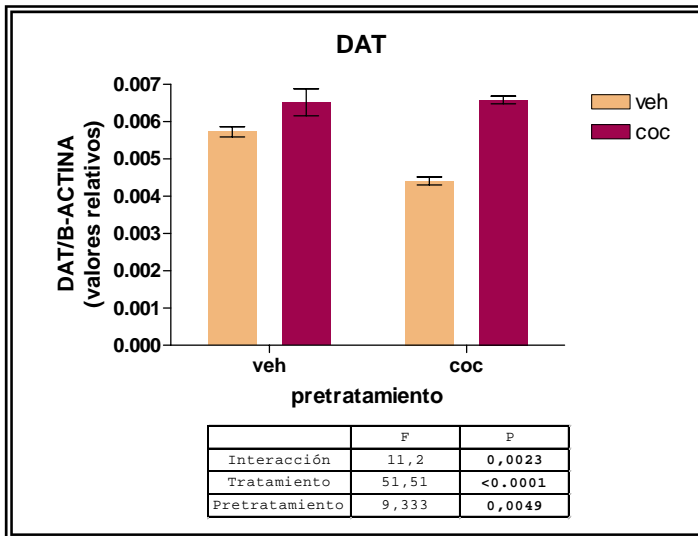
### 2.1.1.3. Transportador

Otro de los componentes del sistema dopaminérgico estudiados en este trabajo es el transportador de dopamina, DAT, encargado de la recaptura presináptica del neurotransmisor. Esta proteína es la diana de la cocaína, que actúa bloqueando la recaptura mediante el bloqueo del transportador. Hay múltiples evidencias en la literatura que indican que el bloqueo de DAT por cocaína y la subsecuente elevación de la dopamina extracelular median la estimulación y los efectos de recompensa de la cocaína.

El análisis estadístico indica que hay diferencias significativas en el nivel de ARNm de DAT debidos tanto al tratamiento como al pretratamiento, además de haber una interacción entre las dos variables (**ver figura 7**). Los niveles de expresión de DAT aumentan de manera más robusta con el tratamiento agudo con cocaína si ha habido un tratamiento crónico previo con cocaína. Además, los niveles basales de ARNm del DAT



bajan significativamente con la administración crónica de cocaína, posiblemente en respuesta al período de descanso tras el tratamiento crónico.

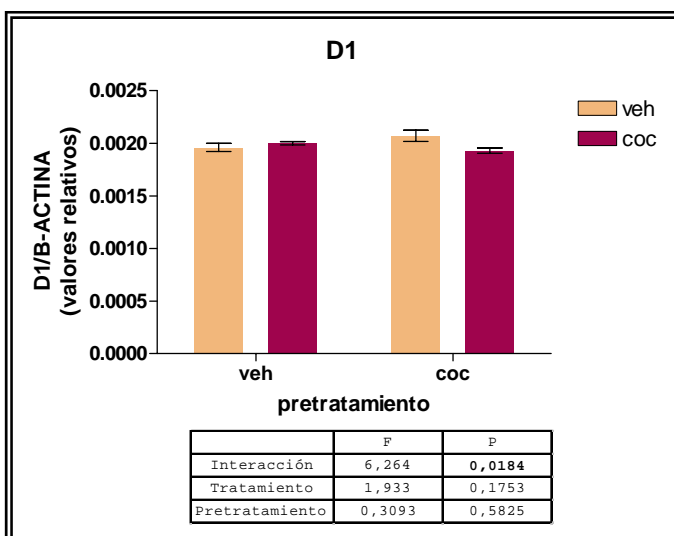


**Figura 7.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de dopamina en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

## 2.1.2. Hipocampo

### 2.1.2.1. Receptor

En este caso (**ver figura 8**), el análisis estadístico solo nos indica que hay interacción entre las dos variables, pero no hay efecto significativo sobre la expresión del receptor de dopamina D1. De manera que podríamos decir que en el caso del hipocampo la cocaína no produce variaciones en la expresión génica del receptor D1 de manera significativa.

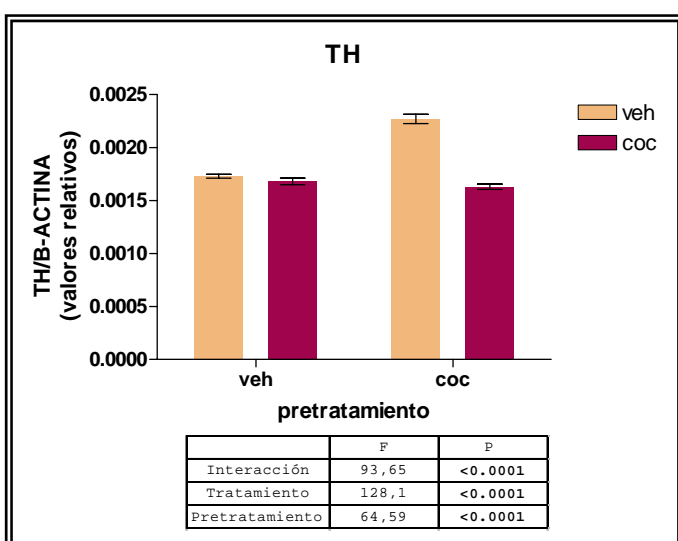


**Figura 8.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor de dopamina, D1 en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



### 2.1.2.2. Síntesis

No ocurre lo mismo que en el caso del receptor (**ver figura 9**), ya que al estudiar la síntesis de dopamina el análisis estadístico de los resultados nos muestra que hay cambios significativos debidos al pretratamiento recibido, al tratamiento agudo y además, hay interacción entre ellos. En este caso, los niveles basales de ARNm de la TH aumentan significativamente con un pretratamiento crónico con cocaína, además de que en estos dos grupos el efecto de la dosis aguda posterior produce una disminución mayor de los niveles de expresión de la enzima en comparación con lo que ocurre en el caso de que el pretratamiento se haya realizado con suero salino. Estas acciones son especulares con respecto a las encontradas en estriado. Hay que tener en cuenta que en el hipocampo hay una fuerte presencia de terminales noradrenérgicos, por cual estos podrían contribuir a las acciones descritas.



**Figura 9.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de la enzima de síntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

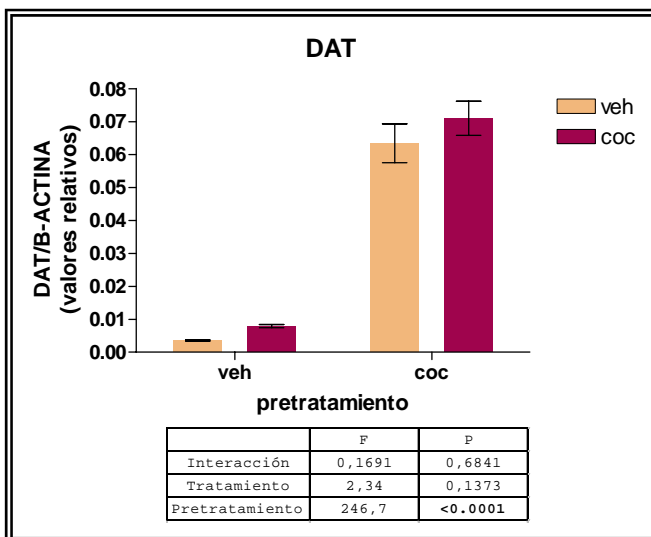
### 2.1.2.3. Transportador

Según los resultados de la **figura 10**, el transportador de dopamina, DAT, sería el componente del sistema dopaminérgico más afectado en el hipocampo por la administración crónica con cocaína. El ANOVA de dos vías nos muestra que hay un efecto significativo del



pretratamiento, es decir, el hecho de que haya habido un tratamiento crónico con cocaína aumenta de manera significativa los niveles del transportador en el hipocampo, sin que afecten tratamientos posteriores.

El hecho de que estos animales sensibilizados muestren un incremento en la TH unido al fuerte incremento en el transportador indican que en el hipocampo la sensibilización/locomoción condicionada tiene un sustrato dopaminérgico importante que podría estar relacionado con la memoria contextual que se activa en los procesos de condicionamiento espacial asociados a la administración de cocaína.



**Figura 10.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de dopamina en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

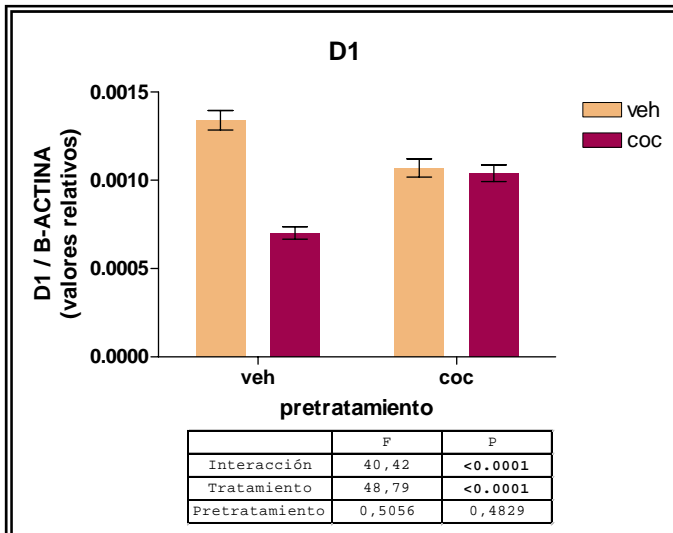
### 2.1.3. Corteza prefrontal

#### 2.1.3.1. Receptor

El nivel de expresión de ARNm del receptor de dopamina D1 en corteza prefrontal (ver figura 11) varía significativamente debido al tratamiento agudo, además de mostrar un efecto debido a la interacción entre el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo. De esta manera, podemos decir que el tratamiento agudo con cocaína disminuye los niveles del receptor de dopamina, siendo más fuerte el descenso de los niveles de ARNm si no ha habido previamente un pretratamiento crónico con cocaína. Este hecho indica que la corteza



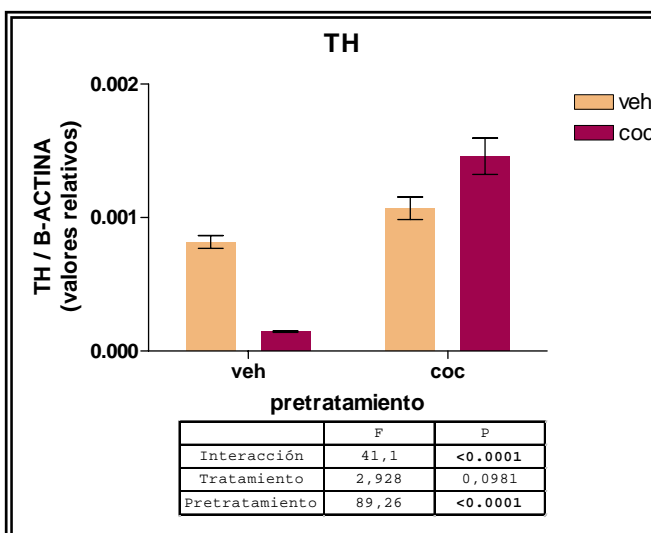
prefrontal es un sustrato importante en la sensibilización a cocaína, posiblemente al determinar estrategias comportamentales fijas (estereotipias, locomoción condicionada, condicionamiento, etc.).



**Figura 11.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor de dopamina D1 en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.1.3.2. Síntesis

En el caso de la síntesis de dopamina en corteza prefrontal (**ver figura 12**), los resultados nos indican que los cambios en la expresión génica de la enzima TH son debidos al tratamiento agudo, aunque igual que en el caso del receptor D1 en esta zona, hay una interacción entre el pretratamiento y el tratamiento. Los niveles de expresión de la TH disminuyen con el tratamiento agudo. Sin embargo, si ha habido un pretratamiento crónico con cocaína, los niveles de expresión de la TH aumentan.

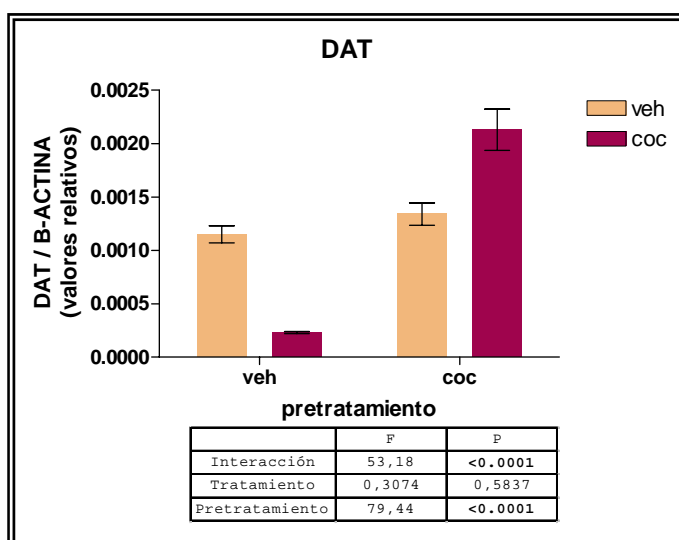


**Figura 12.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de la enzima de síntesis de la dopamina en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



### 2.1.3.3. Transportador

Con respecto al transportador de dopamina, ocurre lo mismo que en el caso de la síntesis, los resultados nos indican que los cambios en la expresión génica de DAT (**ver figura 13**) son debidos al tratamiento agudo, aunque igual que en el caso del receptor D1 en esta zona, hay una interacción entre el pretratamiento y el tratamiento. Los niveles de expresión de DAT disminuyen con el tratamiento agudo. Sin embargo, si ha habido un pretratamiento crónico con cocaína, los niveles de expresión de DAT aumentan.

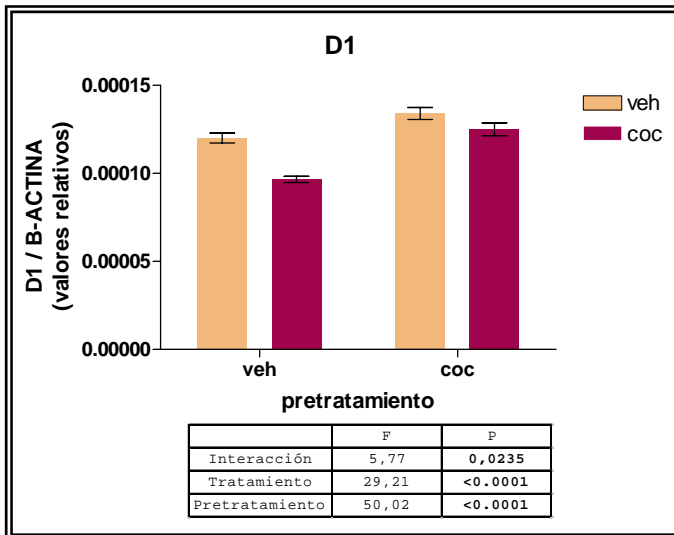


**Figura 13.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de dopamina en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.1.4. Cerebelo

#### 2.1.4.1. Receptor

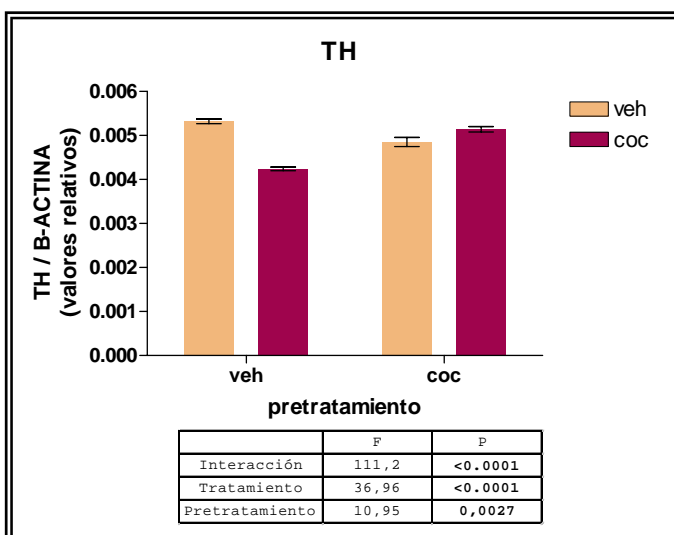
Los niveles de expresión del transportador de dopamina en el cerebelo (**ver figura 14**) muestran variaciones significativas debidas al pretratamiento que hayan recibido los ratones, al tratamiento agudo que recibieran después y además, a una interacción entre las dos variables, según el ANOVA de dos vías. Los niveles de ARNm del receptor descienden con el tratamiento agudo con cocaína, en relación con el efecto del vehículo. Pero además, esta disminución es mayor en el caso de que no haya habido un contacto previo con la droga.



**Figura 14.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor de dopamina D1 en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.1.4.2. Síntesis

En el cerebelo, el análisis por PCR a tiempo real de la enzima de síntesis de la dopamina (ver figura 15) muestra diferencias debidas a las dos variables tenidas en cuenta, además de una interacción entre ellas. El efecto del tratamiento agudo con cocaína es diferente según haya habido un pretratamiento crónico previo con cocaína o no, de manera que en el caso de que el tratamiento agudo con cocaína sea el primer contacto con la droga habrá una disminución de la expresión de la enzima de síntesis en comparación con los niveles del grupo control. Sin embargo, si ha habido un pretratamiento con cocaína, los niveles de ARNm de la TH aumentan con respecto al grupo que recibe una dosis aguda de vehículo.

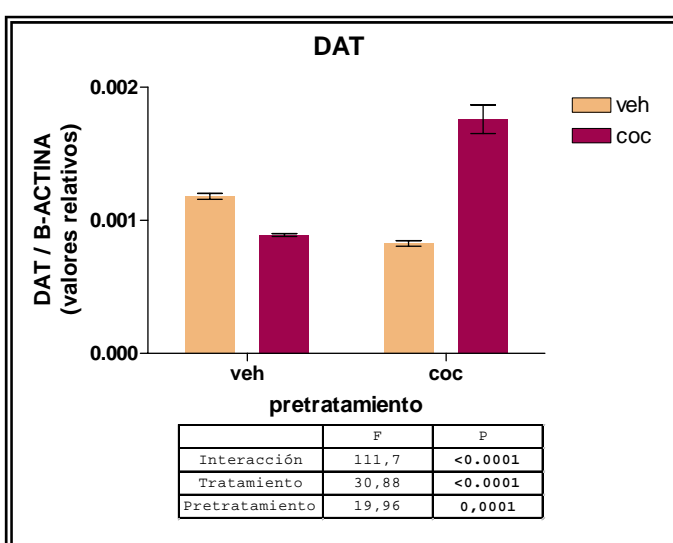


**Figura 15.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de la enzima de síntesis de la dopamina en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



### 2.1.4.3. Transportador

Con respecto al transportador de dopamina en el cerebelo (**ver figura 16**) también aparecen diferencias significativas debidas a las dos variables tenidas en cuenta, además de una interacción entre ellas. En este caso, el nivel de ARNm de DAT disminuye con la primera dosis aguda de cocaína, mientras que aumenta significativamente si ha habido un tratamiento crónico previo con cocaína. De hecho, los niveles de DAT están aumentados de manera basal en los animales que han recibido un pretratamiento con cocaína.



**Figura 16.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de dopamina en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

## 2.2. Sistema cannabinoide

Todas las evidencias indican que el sistema endocannabinoide es un importante constituyente de los sustratos neuronales implicados en la adicción. De hecho, las neuronas dopaminérgicas de la vía mesocorticolímbica están controladas por inputs excitatorios e inhibitorios que son modulados por el receptor CB1. Otra de las razones de peso para estudiar el sistema cannabinoide en nuestro modelo animal es que los endocannabinoides participan en la plasticidad sináptica del sistema mesolímbico, relacionada con los procesos de aprendizaje asociados al comportamiento adictivo, y son potentes moduladores de la transmisión glutamatérgica.



En este apartado veremos como afectan los diferentes patrones de administración a la expresión génica de los distintos componentes del sistema endocannabinoide. A su vez el estudio se volvió a repetir en las cuatro zonas cerebrales estudiadas en el caso anterior: estriado, hipocampo, corteza prefrontal y cerebelo.

Para comprobar si los cambios observados en los niveles de ARNm de los distintos componentes del sistema cannabinoide, obtenidos mediante PCR a tiempo real, se correspondían con una alteración en el nivel de expresión de las proteínas correspondientes, se analizó también mediante Western Blots el nivel de las proteínas de los mismos componentes del sistema.

### **2.2.1. Estriado**

#### **2.2.1.1. Receptor**

El receptor cannabinoide tipo 1 es un receptor metabotrópico acoplado a proteínas Gi/o, de manera que modula a la adenil ciclasa, a los canales iónicos y a las kinasas reguladas por señales extracelulares. La densidad de este receptor es muy elevada en el SNC, aunque también se ha descrito a nivel periférico.

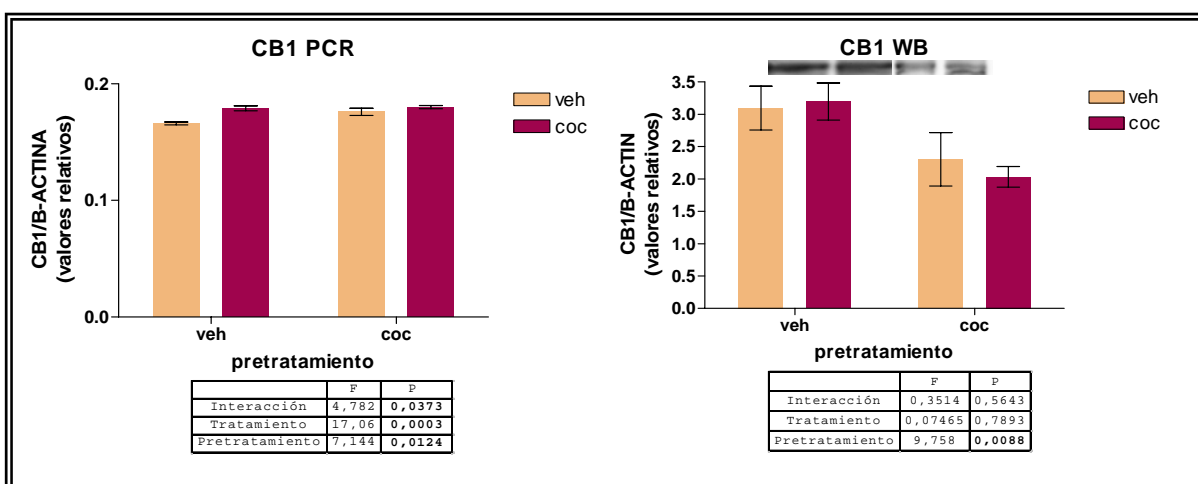
Se ha demostrado que los cannabinoides tienen la capacidad de activar el sistema mesolímbico dopaminérgico, lo cual se relaciona con la aparición de los efectos reforzantes de todas las drogas de abuso. Pero los cannabinoides no afectan directamente a la actividad de los terminales axónicos de las neuronas dopaminérgicas, sino que controlarían la actividad dopaminérgica mediante la regulación de la liberación de otros neurotransmisores como el GABA y el glutamato. Así, se ha descrito que receptores CB1 localizados presinápticamente regulan la liberación de glutamato y GABA en el área tegmental ventral, modificando la actividad eléctrica de estas neuronas dopaminérgicas.

El análisis de la expresión de ARNm del receptor CB1 en el estriado (**ver figura 17**) nos muestra diferencias significativas entre los grupos, debidas a tanto al pretratamiento



recibo, como al tratamiento agudo posterior, como a una interacción entre ellas. De manera que los niveles de ARNm de CB1 aumentan siempre que hay un tratamiento agudo con cocaína, aunque en el caso de que no haya habido contacto previo con la droga, el aumento de expresión de CB1 es mayor.

Sin embargo, los niveles de la proteína medidos por western blot nos muestran que solo aparecen diferencias significativas debidas al pretratamiento, y por tanto los niveles de CB1 en membrana disminuyen drásticamente cuando hay un pretratamiento crónico con cocaína, en comparación con los niveles basales de los animales tratados con vehículo. Esto indica una disociación entre expresión y traducción a nivel estriatal.



**Figura 17.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína del receptor cannabinoide tipo 1 en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales

#### 2.2.1.2. Síntesis

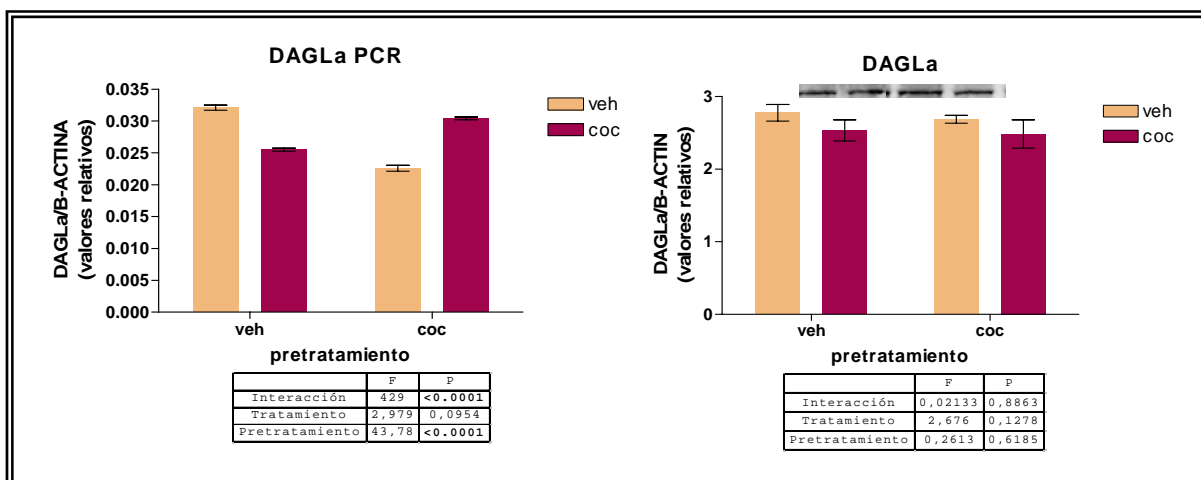
Los dos principales cannabinoides endógenos son la anandamida y el 2-AG, son agonistas del receptor CB1, de naturaleza lipídica. La síntesis de de la anandamida se produce por la hidrólisis del fosfolípido precursor N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE), reacción catalizada por la fosfolipasa D (PLD), produciendo ácido fosfatídico y anandamida (Piomelli y cols., 1998).



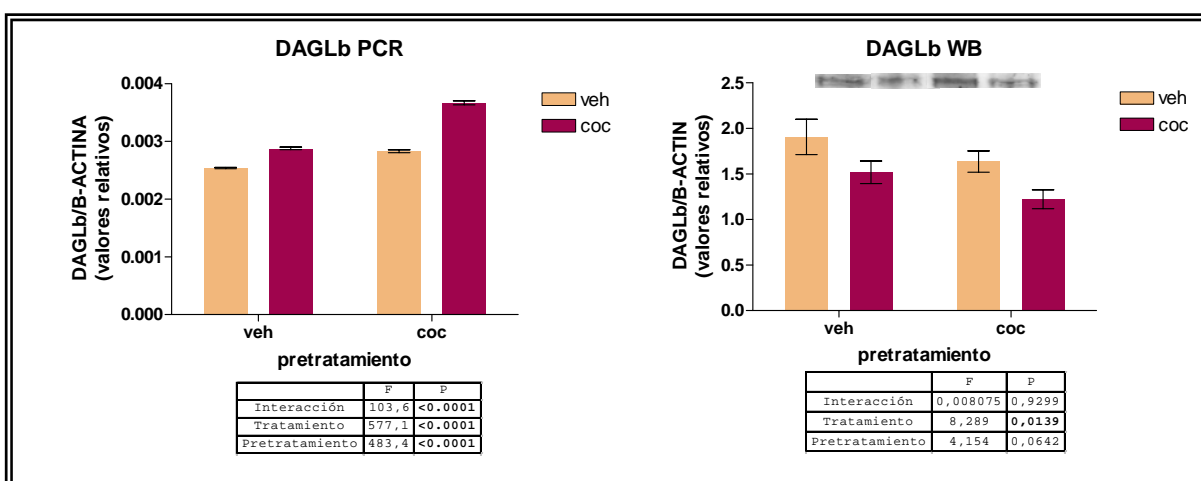
El 2-AG presenta menor afinidad que la anandamida por los receptores cannabinoides, pero se halla presente en el cerebro a concentraciones mucho mayores que esta última (Sugiera et al., 1995). La síntesis de 2-AG comienza cuando el fosfatidilinositol es hidrolizado por una fosfolipasa C (PLC) produciendo diacilglicerol, el cual será convertido en 2-AG por la acción de la diacilglicerol lipasa. Se describe también una segunda vía en la cual la acción de la fosfolipasa A1 (PLA1) sobre el fosfatidilinositol genera un lisofosfolípido que, al ser hidrolizado por la lisofosfolipasa C, generará 2-AG. Además hay dos isoformas de la DAGL, la isoforma alfa y la beta.

Los niveles de ARNm, medidos por PCR a tiempo real, de la isoforma DAGL $\alpha$  en estriado (**ver figura 18**) muestran diferencias significativas debidas al pretratamiento recibido y a una interacción del pretratamiento con el tratamiento subsecuente. Esto es, los niveles de esta isoenzima disminuyen con el tratamiento crónico con cocaína, pero de manera dependiente del tratamiento agudo posterior. Sin embargo, los niveles de proteína no varían con ninguno de los tratamientos, según se aprecia en los resultados del western blot.

En cuanto a la isoforma beta de la enzima de síntesis del 2-AG (**ver figura 19**), el ANOVA de dos vías de los resultados de la PCR a tiempo real, muestra diferencias significativas debidas al pretratamiento, al tratamiento posterior, y a una interacción entre las dos variables. De manera que los niveles de ARNm de esta isoforma enzimática aumentan con el tratamiento agudo de cocaína, pero de manera más robusta si ha habido un pretratamiento crónico previo con cocaína. Sin embargo, los niveles de proteína a nivel de membrana solo nos muestran cambios significativos debidos al tratamiento agudo, independientemente del pretratamiento que hayan tenido. Los niveles de proteína DAGL $\beta$  disminuyen con el tratamiento agudo de cocaína.



**Figura 18.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide diacilglicerol alfa en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

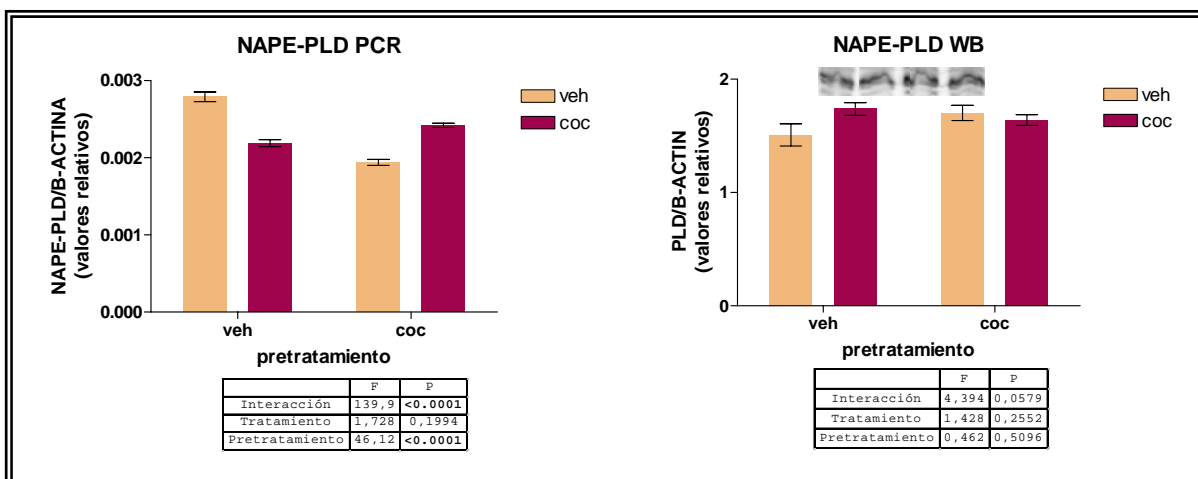


**Figura 19.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide diacilglicerol beta en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

Con respecto a la enzima de síntesis de la anandamida, la NAPE-PLD (ver figura 20), el nivel de ARNm medido por PCR a tiempo real tiene un patrón de expresión similar al de la DAGLa. Aparecen diferencias significativas debidas al pretratamiento y a una interacción de este con el tratamiento agudo. Es decir, los niveles de la enzima de síntesis



disminuyen con el tratamiento crónico con cocaína, y además es responsable de la magnitud del efecto del tratamiento agudo posterior. Sin embargo, los niveles de proteína no varían con ninguno de los tratamientos, como se puede ver en los resultados del western blot.



**Figura 20.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide NAPE-PLD en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

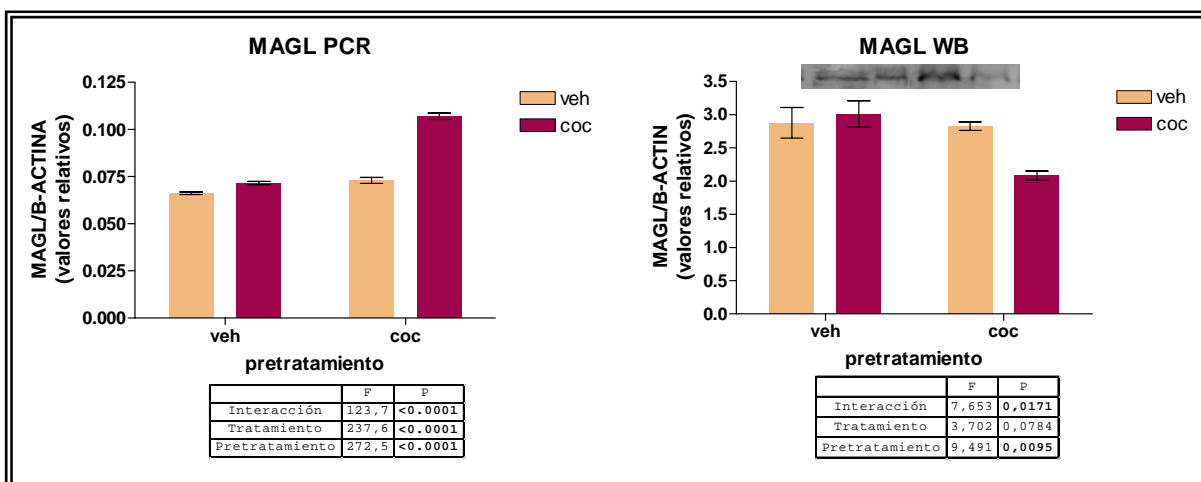
La anandamida es inactivada en el cerebro mediante dos mecanismos complementarios. El primero es la recaptación mediante transportadores específicos, y tras este proceso se produce una degradación enzimática. Se ha identificado una enzima unida a membrana que cataliza la hidrólisis de anandamida a ácido araquidónico y etanolamina, denominada amido hidrolasa de ácidos grasos, FAAH (Cravatt et al., 1996).

El 2-AG es eliminado, como la anandamida, a través de un proceso que consta de dos pasos: la recaptación a través del mismo sistema de transporte que la anandamida, y la posterior degradación enzimática en el interior celular. Se ha descrito que el 2-AG es un sustrato de la FAAH. Sin embargo, también se ha sugerido la existencia de otros enzimas implicados en la degradación del 2-AG. Así se ha demostrado que la monoglicérido lipasa,

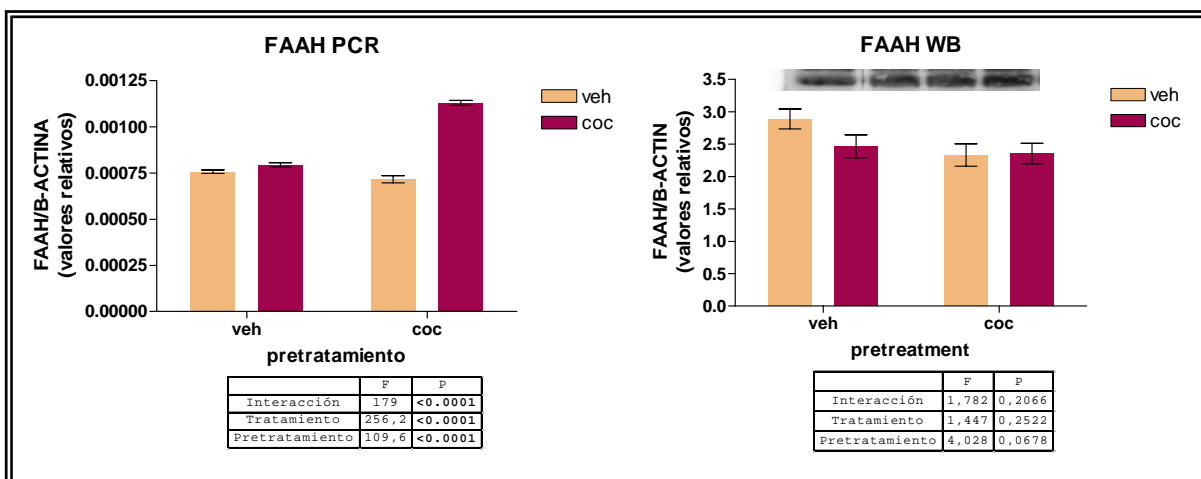


MAGL, puede hidrolizar el 2-AG, pero no la anandamida, sugiriendo que pueda participar específicamente en la inactivación de este endocannabinoide (Dinh et al., 2002).

El ANOVA de dos vías de los resultados de la PCR a tiempo real para la enzima de degradación MAGL en estriado (**ver figura 21**), muestra diferencias significativas debidas



**Figura 21.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación cannabinoide MAGL en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales



**Figura 22.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación de cannabinoides FAAH en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



al pretratamiento, al tratamiento posterior, y a una interacción entre las dos variables. De manera que los niveles de ARNm de esta enzima aumentan con el tratamiento agudo de cocaína, pero de manera más robusta si ha habido un pretratamiento crónico previo con la droga. Sin embargo, los niveles de proteína a nivel de membrana solo nos muestran cambios significativos debidos al pretratamiento que hayan recibido, pero con un efecto dependiente del tratamiento agudo. Los niveles de proteína MAGL disminuyen con el pretratamiento crónico con cocaína.

En cuanto a la enzima de degradación FAAH en estriado (**ver figura 22**), el ANOVA de dos vías de los resultados de la PCR a tiempo real, muestra diferencias significativas debidas al pretratamiento, al tratamiento posterior, y a una interacción entre las dos variables. De manera que los niveles de ARNm de esta enzima aumentan con el tratamiento agudo de cocaína, pero de manera más robusta si ha habido un pretratamiento crónico previo con cocaína. Sin embargo, los niveles de proteína a nivel de membrana no muestran cambios significativos.

## **2.2.2. Hipocampo**

### **2.2.2.1. Receptor**

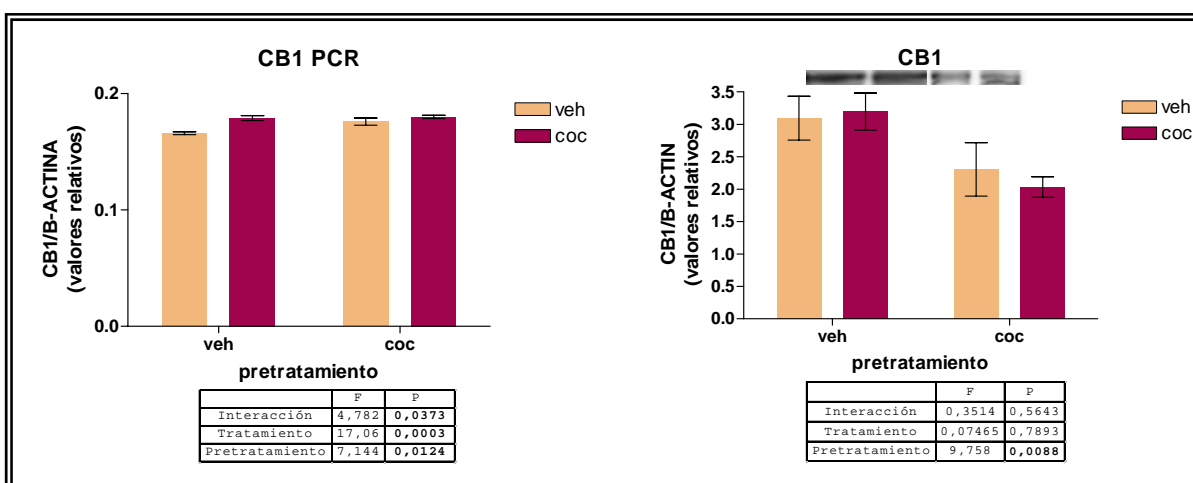
En el área hipocampal, la expresión de ARNm del receptor CB1 (**ver figura 23**) se ve afectada tanto por el tratamiento agudo, como por el pretratamiento que hayan tenido inicialmente, además de ser el efecto de uno dependiente del otro. Es decir, la cocaína administrada de forma aguda aumenta los niveles de ARNm del receptor cannabinoide, pero de una manera más fuerte en el caso de no haber habido contacto previo con la cocaína. Sin embargo, si nos fijamos en la expresión de la proteína en la membrana, podemos ver que solo hay un efecto del pretratamiento, de manera que el pretratamiento crónico con cocaína disminuye significativamente el número de receptores en la membrana.



### 2.2.2.2. Síntesis

Los niveles de expresión de ARNm de la enzima de síntesis DAGL $\alpha$  en el hipocampo (ver **figura 24**) se ven afectados por el pretratamiento que hayan recibido los ratones, pero de manera dependiente del tratamiento agudo posterior. Así, los niveles de DAGL $\alpha$  disminuyen con el pretratamiento con cocaína, pero de una manera más suave si ha habido una administración aguda de cocaína. Es decir, el tratamiento agudo con cocaína revierte la disminución de la síntesis de cannabinoides producida por el tratamiento crónico.

No obstante, los niveles de enzima expresada a nivel de membrana solo varían con el pretratamiento, y de tal manera que la administración crónica con cocaína aumenta los niveles de proteína, lo que podría indicar mayor actividad de síntesis.

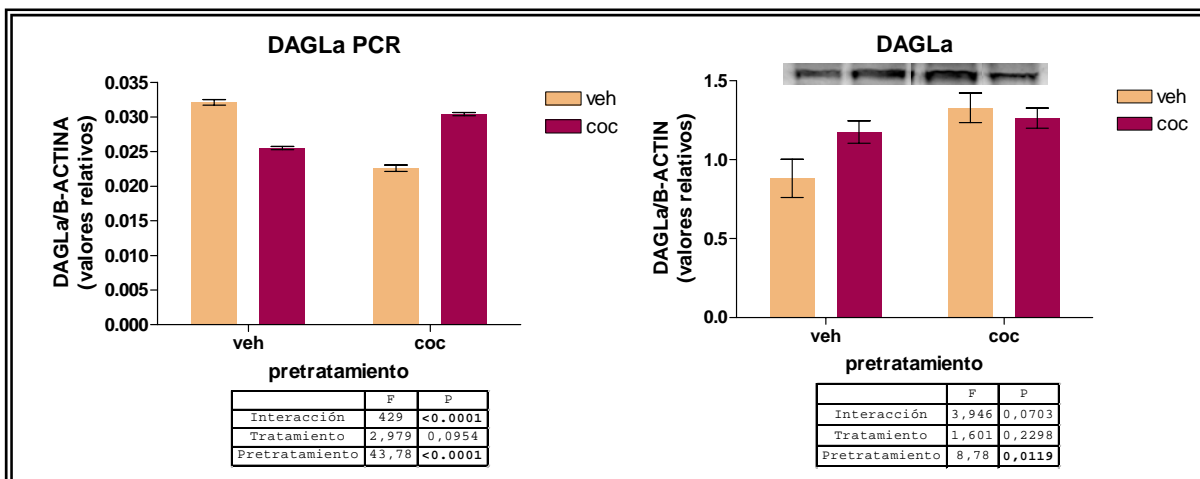


**Figura 23.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína del receptor CB1 en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

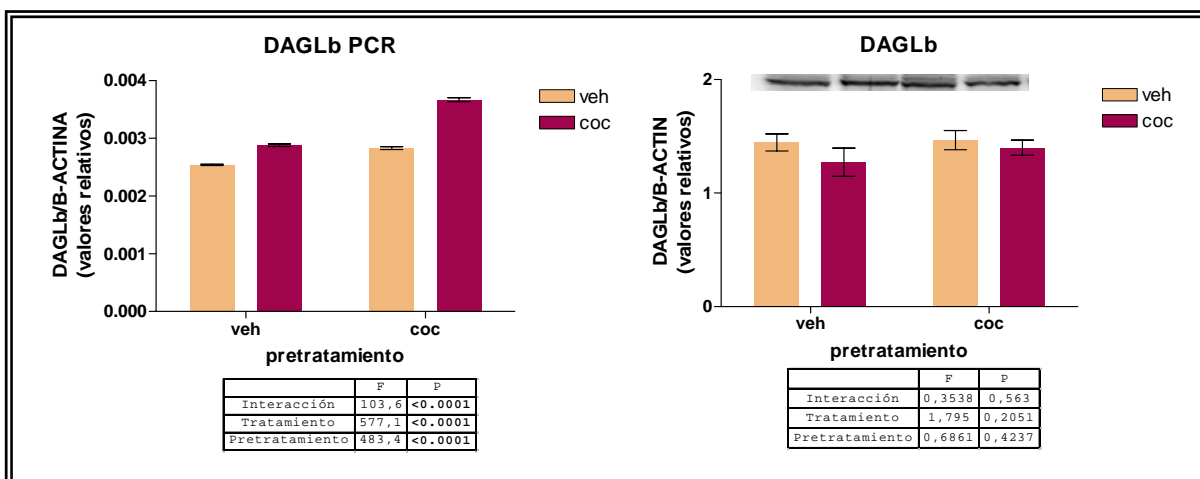
Con respecto a la otra isoforma de la enzima de síntesis del cannabinoide 2-AG, los niveles de ARNm en hipocampo (ver **figura 25**) se ven afectados tanto por el pretratamiento recibido, como por el tratamiento agudo posterior, como por una interacción entre ellos. Los niveles de expresión de DAGL $\beta$  aumentan con una administración crónica de cocaína, pero esta elevación del nivel del ARNm es mayor si después hay una administración aguda de



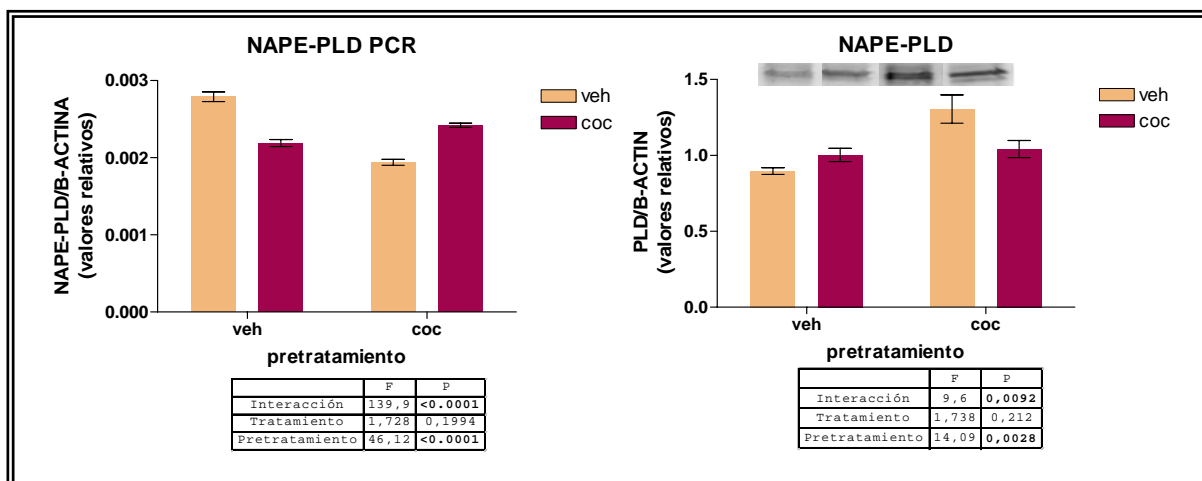
cocaína. Sin embargo, el nivel de proteína no se ve afectado significativamente por ningún tipo de administración de cocaína. Esto indica que hay regulación diferencial DAGL $\alpha$ /DAGL $\beta$  dependiendo del área de estudio.



**Figura 24.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide DAGL $\alpha$  en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 25.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide DAGL $\beta$  en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 26.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide NAPE-PLD en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como

En cuanto a la enzima de síntesis de la anandamida, los niveles de ARNm en hipocampo (**ver figura 26**) disminuyen con el tratamiento crónico con cocaína, ya que hay un efecto significativo del pretratamiento recibido. Pero además aparece una interacción significativa entre las dos variables que nos indica que esa bajada del nivel de ARNm de la enzima NAPE-PLD es menor si hay una nueva administración de cocaína de forma aguda. En el caso de la expresión de la proteína a nivel de membrana ocurre lo contrario, los niveles de NAPE-PLD aumentan con el pretratamiento crónico, aunque de manera mucho más leve si hay una administración aguda de cocaína.

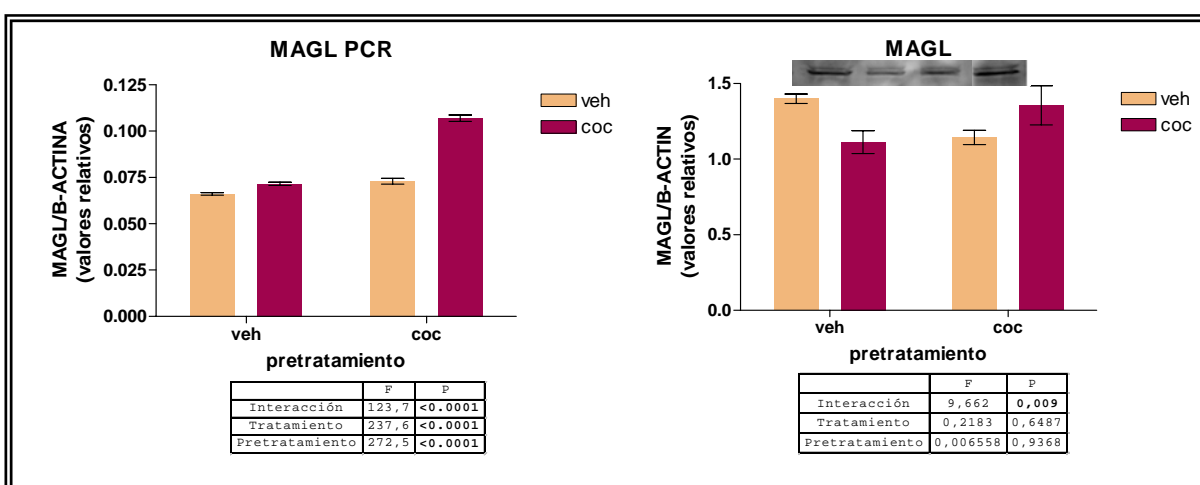
### 2.2.2.3. Degradación

La expresión de la enzima de degradación del 2-AG en hipocampo (**ver figura 27**), se ve afectada significativamente por los dos factores estudiados, además de por una interacción entre ellos. Esto hace que los niveles de ARNm de la enzima MAGL aumenten con una administración aguda de cocaína, pero con una diferencia mayor si ha habido un pretratamiento crónico con cocaína. Con todo, los niveles de proteína a nivel de membrana



solo se ven afectados por una interacción entre el tratamiento y el pretratamiento, aunque no hay diferencias significativas debidas a ninguno de los dos factores.

La enzima de degradación FAAH en hipocampo (**ver figura 28**) sigue el mismo patrón de expresión que la enzima MAGL, los niveles de ARNm aumentan con una administración aguda de cocaína, pero con una diferencia mayor si ha habido un pretratamiento crónico con cocaína. Pero en este caso, los niveles de proteína no varían significativamente con ninguno de los tratamientos ni pretratamientos.



**Figura 27.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación de cannabinoides MAGL en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

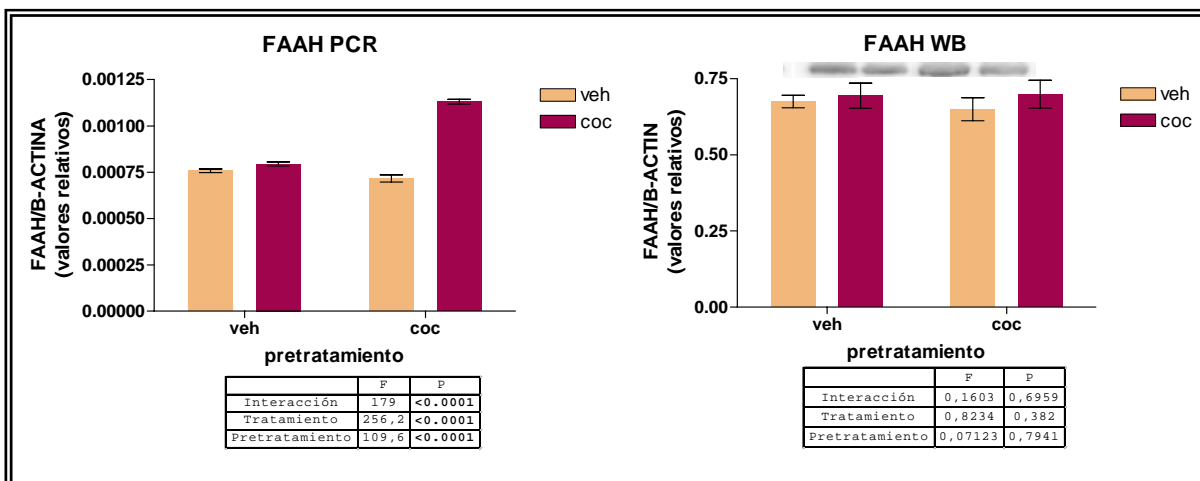
### 2.2.3. Corteza prefrontal

#### 2.2.3.1. Receptor

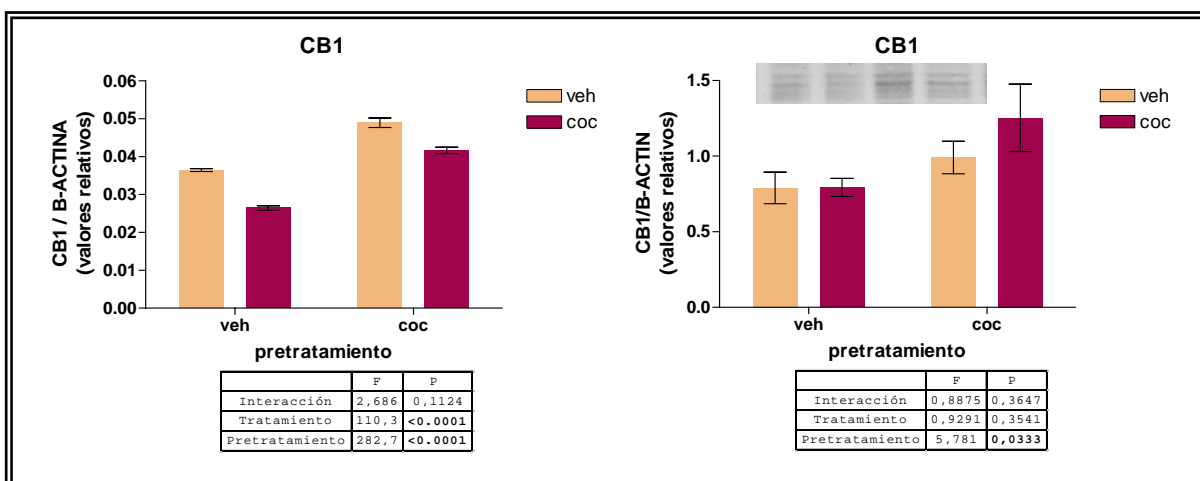
En el caso del receptor CB1 en corteza prefrontal los cambios en la expresión génica son debidos a un efecto del tratamiento agudo con cocaína y al tratamiento previo que hayan recibido los animales de experimentación (**ver figura 29**), de manera independiente entre ellos. De esta manera, el pretratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles de expresión de ARNm de CB1, mientras que el tratamiento agudo los



disminuye. No obstante, los niveles de receptor a nivel de membrana solo se ven afectados por el pretratamiento, sin efecto de una dosis posterior de droga.



**Figura 28.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación cannabinoide FAAH en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

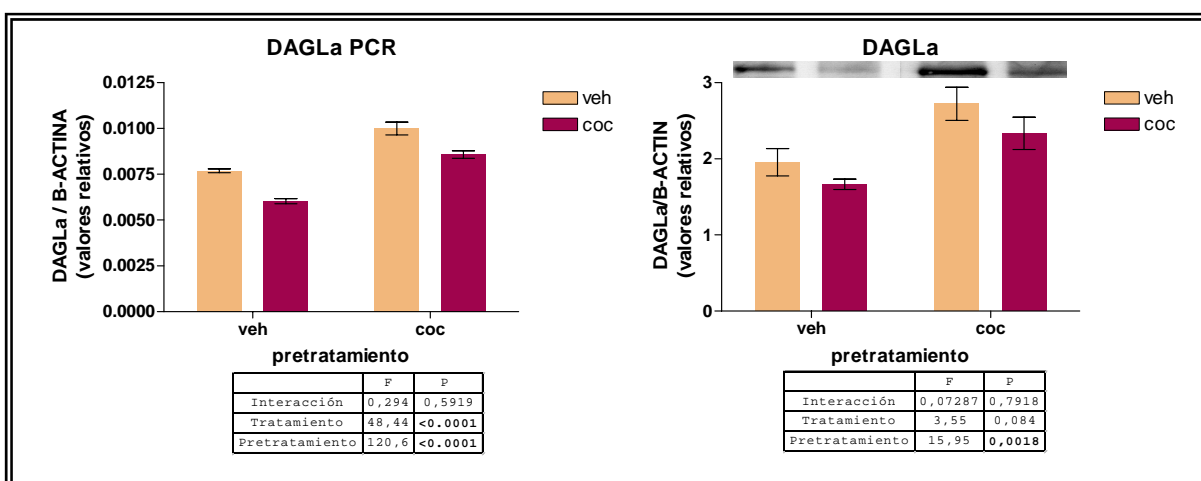


**Figura 29.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína del receptor cannabinoide CB1 en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



### 2.2.3.2. Síntesis

La expresión de ARNm de la enzima de síntesis DAGL $\alpha$  en la corteza prefrontal (**ver figura 30**) se ve afectada tanto por el tratamiento agudo, como por el pretratamiento previo recibido. Es decir, que el pretratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles basales de expresión de DAGL $\alpha$ . En el caso de que haya una administración aguda de cocaína, independientemente del pretratamiento que hayan recibido los ratones, la expresión de esta isoenzima disminuye significativamente. En cuanto a la expresión de la proteína a nivel de membrana solo vemos el efecto debido al pretratamiento, así, no hay efecto del tratamiento agudo sobre la proteína.



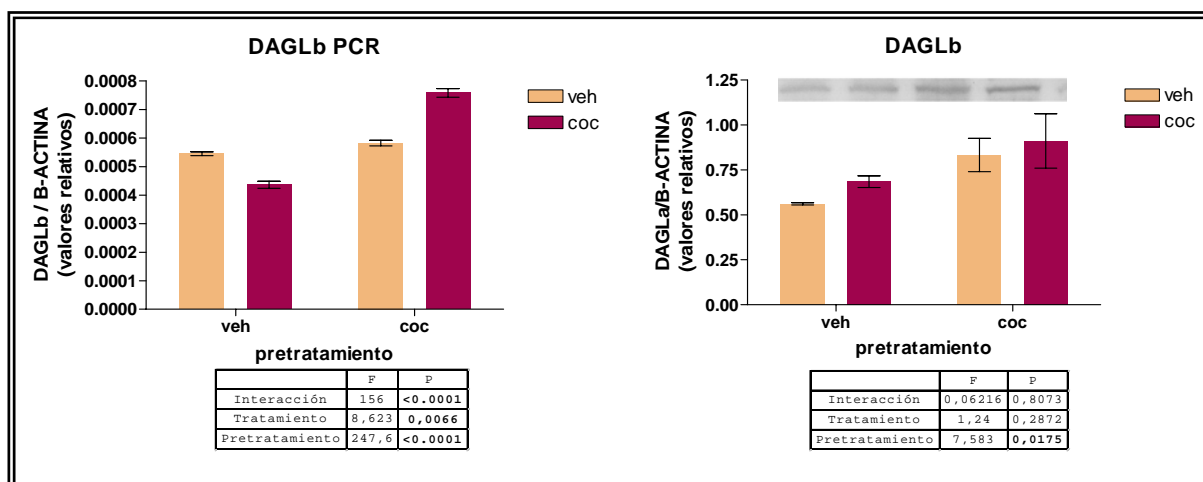
**Figura 30.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide DAGL $\alpha$  en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

que nos ocupa (**ver figura 31**) el efecto del tratamiento agudo y del pretratamiento previo son significativos y dependientes uno del otro. De tal manera que el pretratamiento crónico con cocaína también aumenta los niveles de ARNm de la enzima, pero el tratamiento agudo posterior disminuye los niveles de expresión de la enzima significativamente si no ha habido un pretratamiento con cocaína, y los aumenta si ya hubo un tratamiento crónico con la



enzima. Sin embargo, al estudiar los niveles de la proteína vemos que solo aparece el efecto debido el pretratamiento, sin influir en la cantidad de proteína la administración aguda de cocaína.

Si estudiamos los niveles de ARNm de la enzima de síntesis de la anandamida (ver **figura 32**), vemos que sigue un patrón similar al de la isoforma  $\alpha$  de la enzima DAGL, los niveles de ARNm aumentan con el pretratamiento de cocaína, y que además, cuando se recibe una dosis aguda de cocaína posterior los niveles de ARNm de la enzima disminuyen, independientemente del tratamiento previo. Si estudiamos los niveles de la enzima a nivel de membrana vemos que no hay ningún efecto de la cocaína.



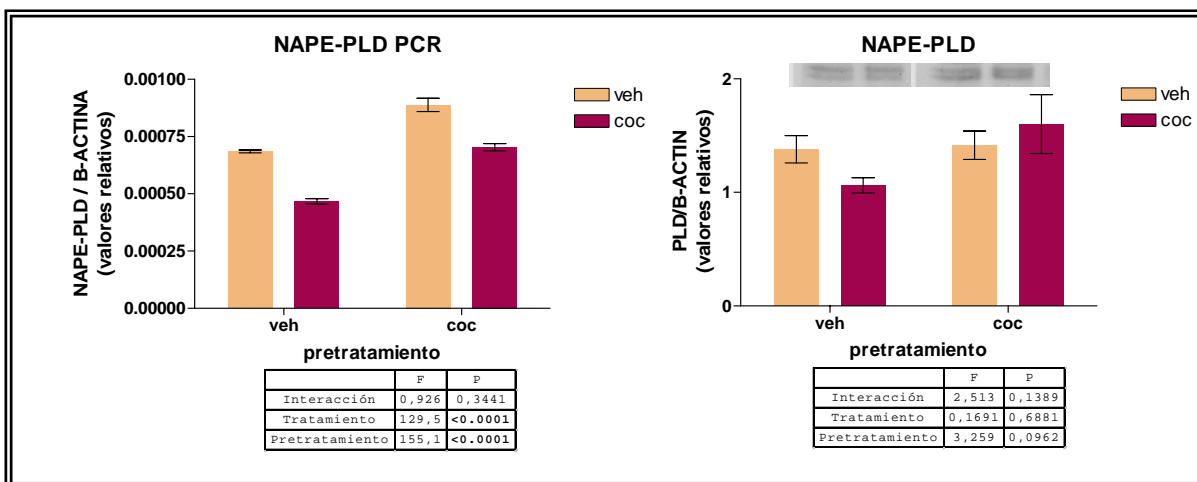
**Figura 31.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide DAGL $\beta$  en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.2.3.3. Degradación

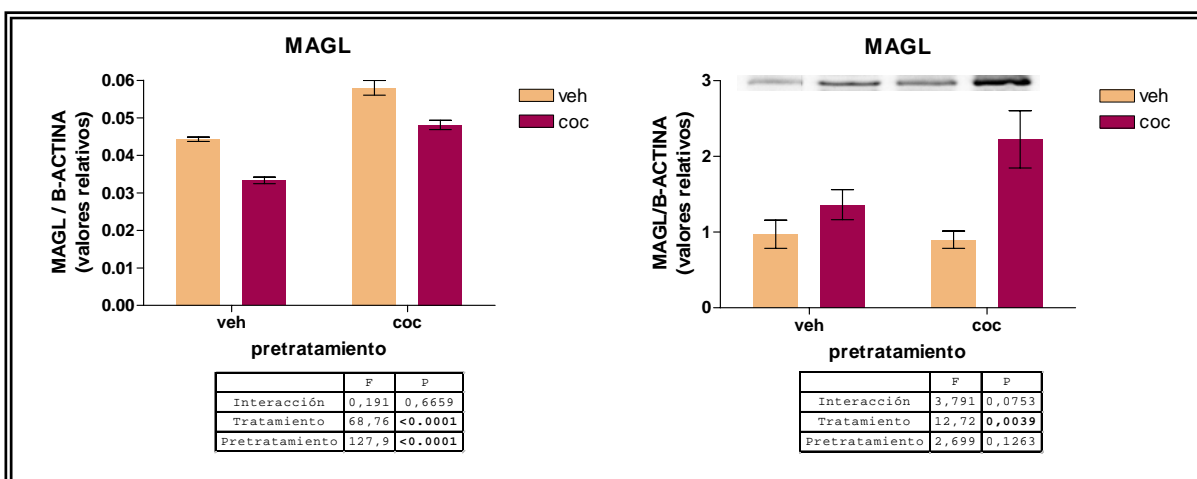
Los niveles de ARNm de la enzima de degradación cannabinoide MAGL en corteza prefrontal (ver **figura 33**), siguen también el patrón de expresión de las enzimas DAGL $\alpha$  y NAPE-PLD. Hay un aumento de los niveles de ARNm de la enzima con el pretratamiento con cocaína, y una disminución si hay una administración aguda posterior, independiente del



pretratamiento. En cuanto a los niveles de proteína solo vemos un efecto del tratamiento agudo, contrario al que veíamos a nivel de ARNm, de manera que hay un aumento de la enzima con una administración aguda de cocaína.



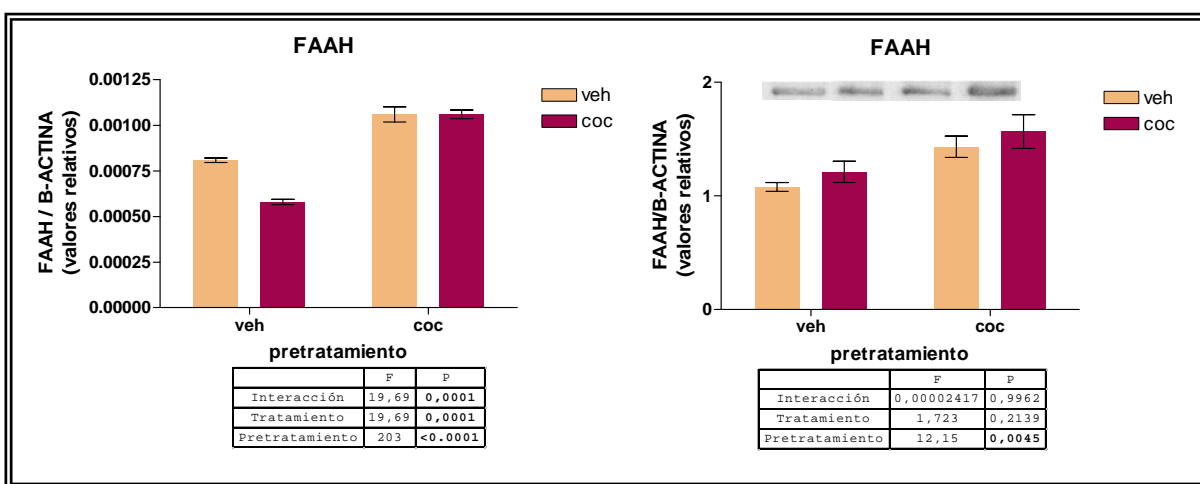
**Figura 32.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide NAPE-PLD en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 33.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide MAGL en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



El estudio de los niveles de ARNm de la enzima de degradación cannabinoide FAAH en corteza prefrontal (**ver figura 34**) se ven afectados por el pretratamiento previo y por el tratamiento agudo posterior, dependientes uno del otro. Así, el tratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles de ARNm de la enzima aumentan; si después hay un tratamiento agudo con cocaína los niveles se verán afectados solo en el caso de que no haya habido un contacto previo con cocaína, lo que hará que disminuyan los niveles de ARNm.



**Figura 34.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación cannabinoide FAAH en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

En el caso de la expresión proteica solo vemos el efecto del pretratamiento, el aumento de los niveles de FAAH a nivel de membrana se corresponde con el que veíamos a nivel de ARNm.

## 2.2.4. Cerebelo

### 2.2.4.1. Receptor

En el caso del cerebelo, los niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 (**ver figura 35**), el estudio estadístico de los resultados obtenidos por PCR a tiempo real nos



indica que hay un efecto de los factores principales, y una interacción entre ellos. Podemos decir que:

- Los niveles de ARNm del receptor se elevan con un tratamiento crónico de cocaína
- El efecto de un tratamiento agudo posterior es dependiente del pretratamiento inicial que hayan recibido, de manera que si no ha habido un contacto previo con la droga, los niveles de ARNm del receptor disminuye. Sin embargo, si ha habido un tratamiento crónico anterior a la dosis aguda, los niveles de ARNm aumentan significativamente.

Si estudiamos los niveles de receptor a nivel de membrana vemos que no hay ningún efecto de la cocaína. Los niveles de receptor en cerebelo no se ven afectados por la cocaína.

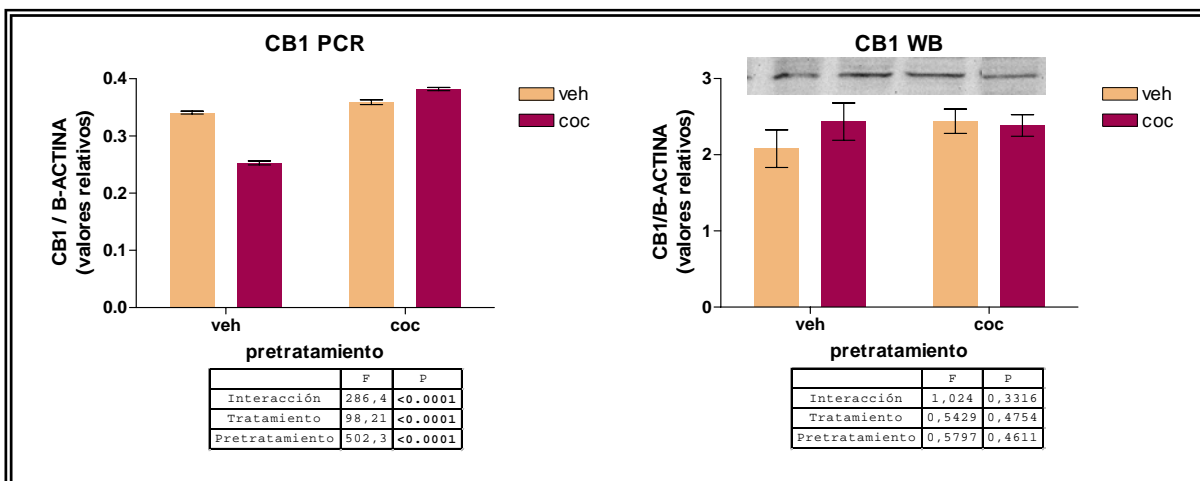
#### 2.2.4.2. Síntesis

El estudio de los niveles de ARNm de la isoforma  $\alpha$  de la enzima de síntesis DAGL en cerebelo (**ver figura 36**) nos indica que hay un efecto del pretratamiento con cocaína, de manera que los niveles de expresión aumenta con la droga administrada de forma crónica. Si hay una administración aguda posterior, esta solo tendrá efecto si no ha habido un pretratamiento previo con la droga. En el caso del nivel de proteína no hay ningún efecto visible.

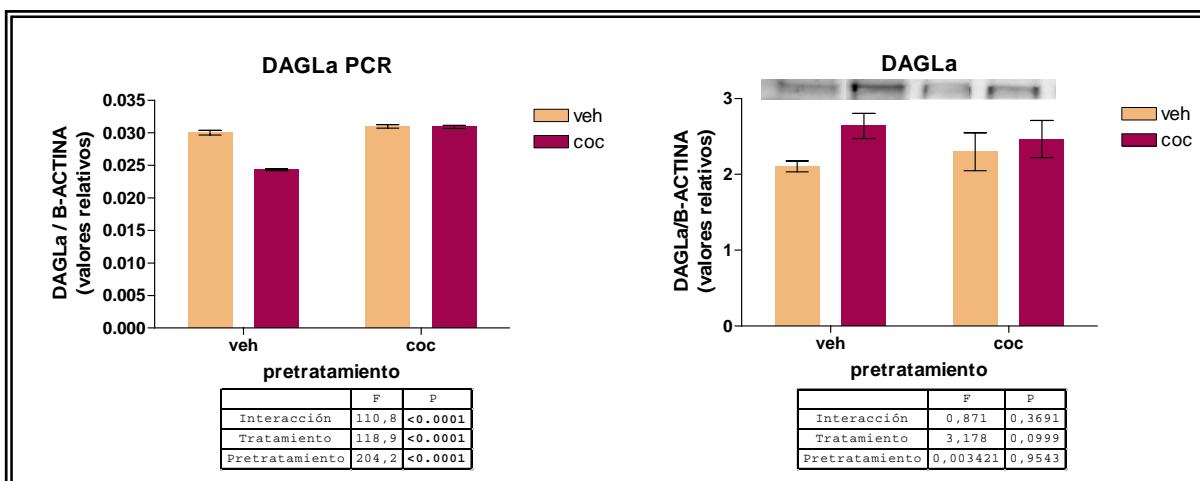
En el caso de la isoforma  $\beta$  en cerebelo (**ver figura 37**), el efecto del pretratamiento es significativo, al igual que el efecto que tiene sobre el nivel de ARNm el tratamiento agudo. Así, vemos que los niveles basales de la enzima aumentan con el pretratamiento crónico con cocaína, y que el tratamiento agudo posterior aumentan aún más estos niveles. Estos cambios se ven reflejados a nivel de membrana. Los niveles de proteína también



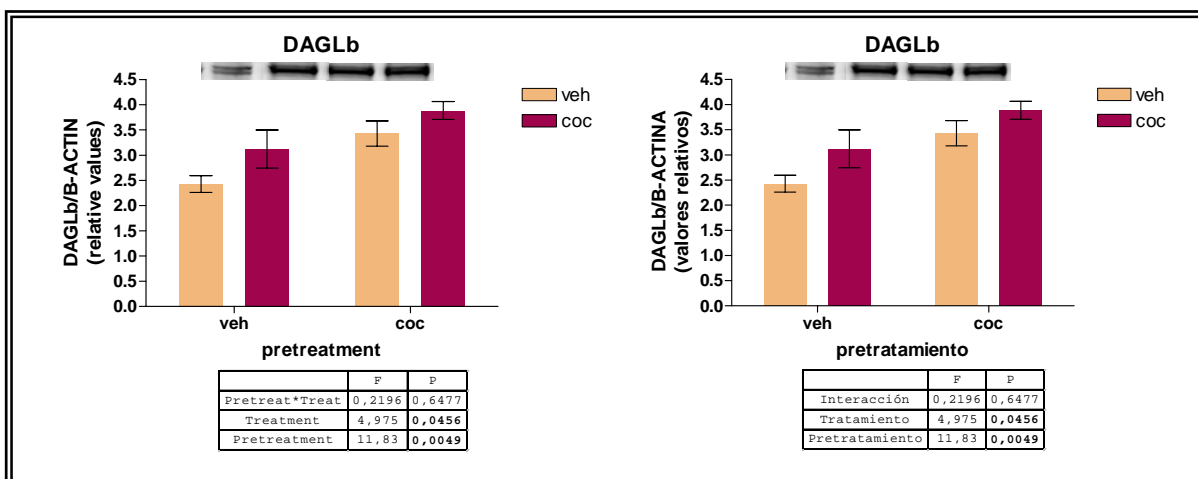
aumentan con el tratamiento crónico con cocaína y ese aumento es aún mayor si hay una administración aguda posterior con la droga.



**Figura 35.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína del receptor cannabinoide CB1 en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 36.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y proteína de la enzima de síntesis cannabinoide DAGLa en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 37.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y proteína de la enzima de síntesis cannabinoide DAGLβ en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

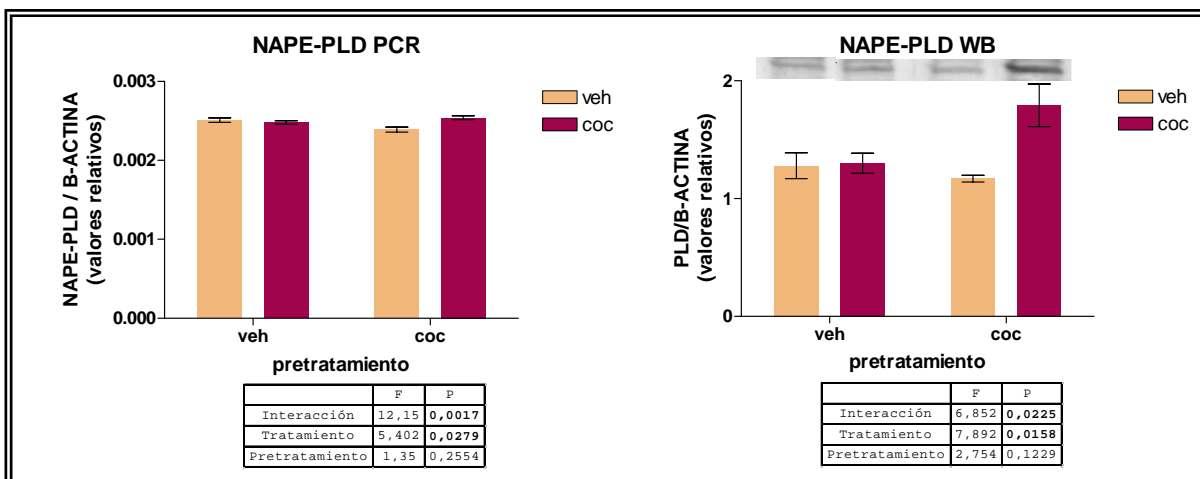
El estudio de la enzima de síntesis de cannabinoides NAPE-PLD (ver **figura 38**) muestra que, tanto los niveles de ARNm como de proteína, se ven afectados por la administración aguda de cocaína, pero de manera diferente si ha habido contacto previo con cocaína o no. De esta manera los niveles de ARNm y de proteína de la enzima de síntesis aumentan con la administración aguda de cocaína si ha habido previamente un tratamiento agudo con cocaína.

#### 2.2.4.3. Degradación

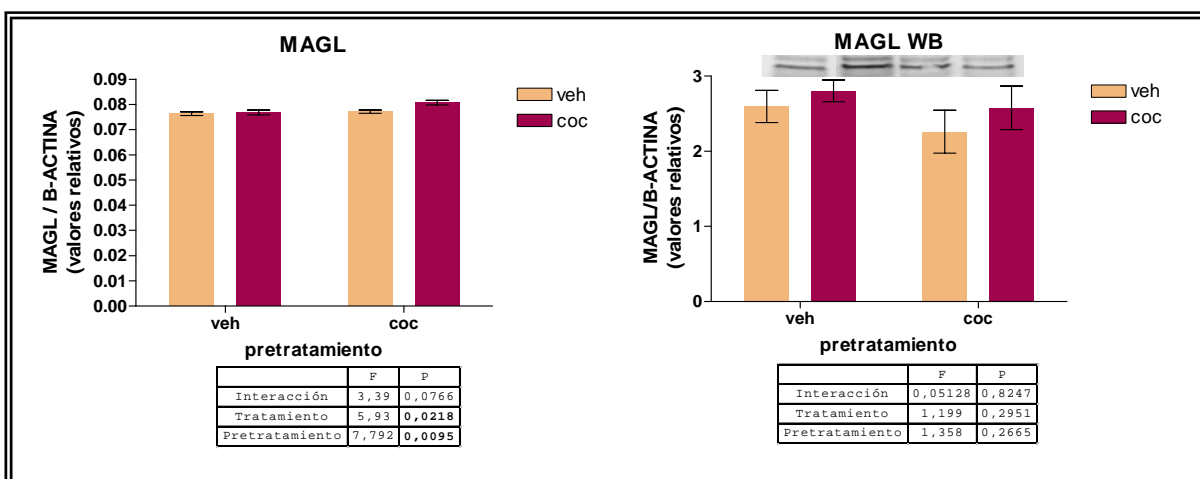
La expresión de la enzima de degradación de 2-AG en el cerebelo (ver **figura 39**) se ve afectada por los dos factores principales del experimento. Hay un aumento de los niveles de ARNm debido a un pretratamiento crónico con cocaína, pero además hay una elevación debida al tratamiento agudo con cocaína, en comparación con los que recibieron vehículo en vez de la dosis aguda de cocaína. Con respecto a los niveles de proteína no hay ningún cambio debido a la cocaína.



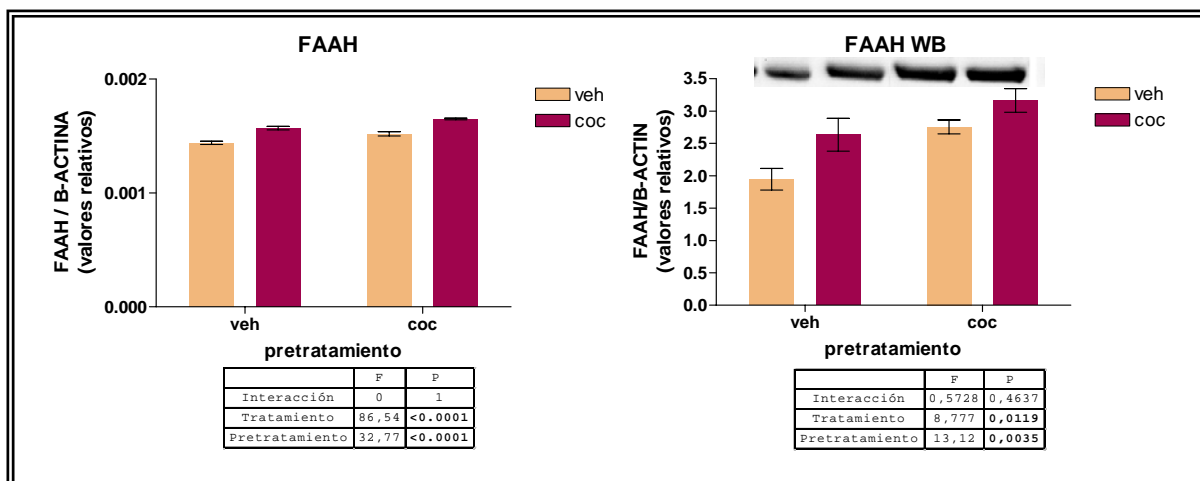
Sin embargo, la expresión de ARNm y de proteína de FAAH (ver **figura 40**) se ven afectados también por los dos factores estudiados, hay un aumento de los niveles basales tanto de ARNm, como de proteína con el tratamiento crónico con cocaína, y además, hay un aumento de estos niveles si después reciben una administración de droga aguda.



**Figura 38.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de síntesis cannabinoide NAPE-PLD en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 39.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación cannabinoide MAGL en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 40.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm y de proteína de la enzima de degradación cannabinoide en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.3. Sistema glutamatérgico

La transmisión glutamatérgica juega un papel activo en las acciones de las drogas ya que el estriado está abundantemente inervado con aferencias glutamatérgicas, y los receptores NMDA, principalmente las subunidades NR1 y NR2B, están densamente expresadas en las neuronas estriatales, como ya vimos en la introducción.

El mecanismo que probablemente es el responsable de la sensibilización de los efectos estimulantes de la locomoción por cocaína es la LTD en el NAc. Esta forma de plasticidad está promovida por la estimulación de alta frecuencia de las aferencias glutamatérgicas que conectan los núcleos límbicos con las neuronas del estriado, de manera que el NAc se vuelve refractario a través de la inhibición a largo plazo de la liberación de glutamato.

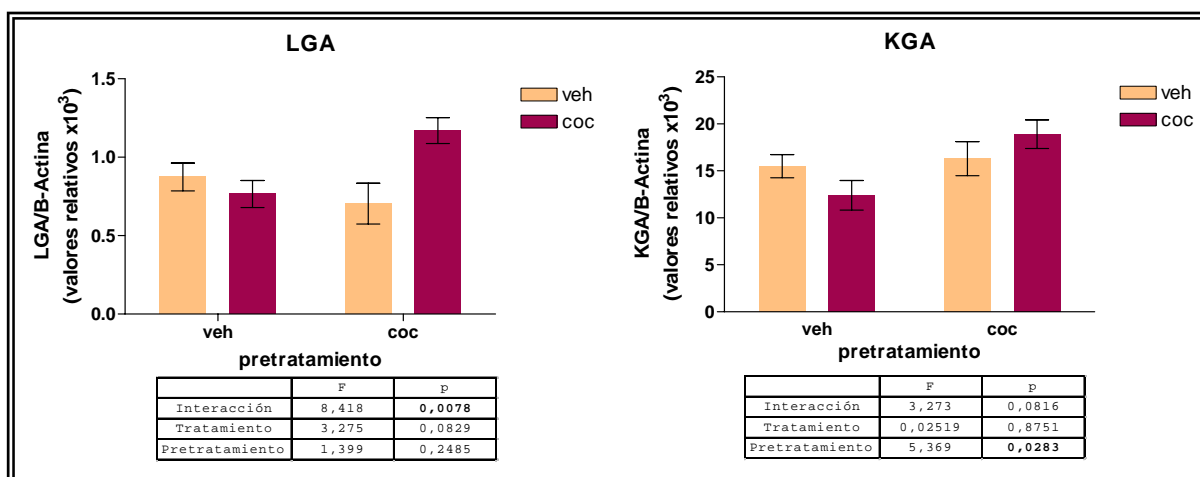
#### 2.3.1. Estriado

##### 2.3.1.1. Síntesis



El aminoácido glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y por tanto su síntesis y degradación en el cerebro recibe una considerable atención. La glutaminasa activada por fosfato cataliza la reacción de glutamina a glutamato y amonio. Esta enzima necesita de fosfato inorgánico para la actividad in vitro y juega un papel clave en la síntesis del neurotransmisor glutamato en cerebro. Esta enzima tiene dos isoformas, la LGA, típica de hígado, se ha demostrado que además se expresa en cerebro, páncreas, y células de cáncer de mama. Por otra parte, la isoforma K, descubierta en riñón, parece ser ubicua y se encuentra en todos los tejidos con actividad glutaminasa.

La medida de la expresión génica de las dos isoformas en estriado (ver figura 41), mediante PCR a tiempo real, dio como resultado que el nivel de la isoforma L no varía con el pretratamiento crónico con cocaína, ni aún con el tratamiento agudo con esta droga. Sin embargo, la isoforma K de la glutaminasa muestra cambios significativos en los niveles de ARNm debidos al tratamiento inicial con la droga. Así, los niveles basales de expresión de la glutaminasa K aumentan con el tratamiento crónico con cocaína.



**Figura 41.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las dos isoformas de la enzima de síntesis del glutamato, LGA y KGA en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



### 2.3.1.2. Receptor NMDA

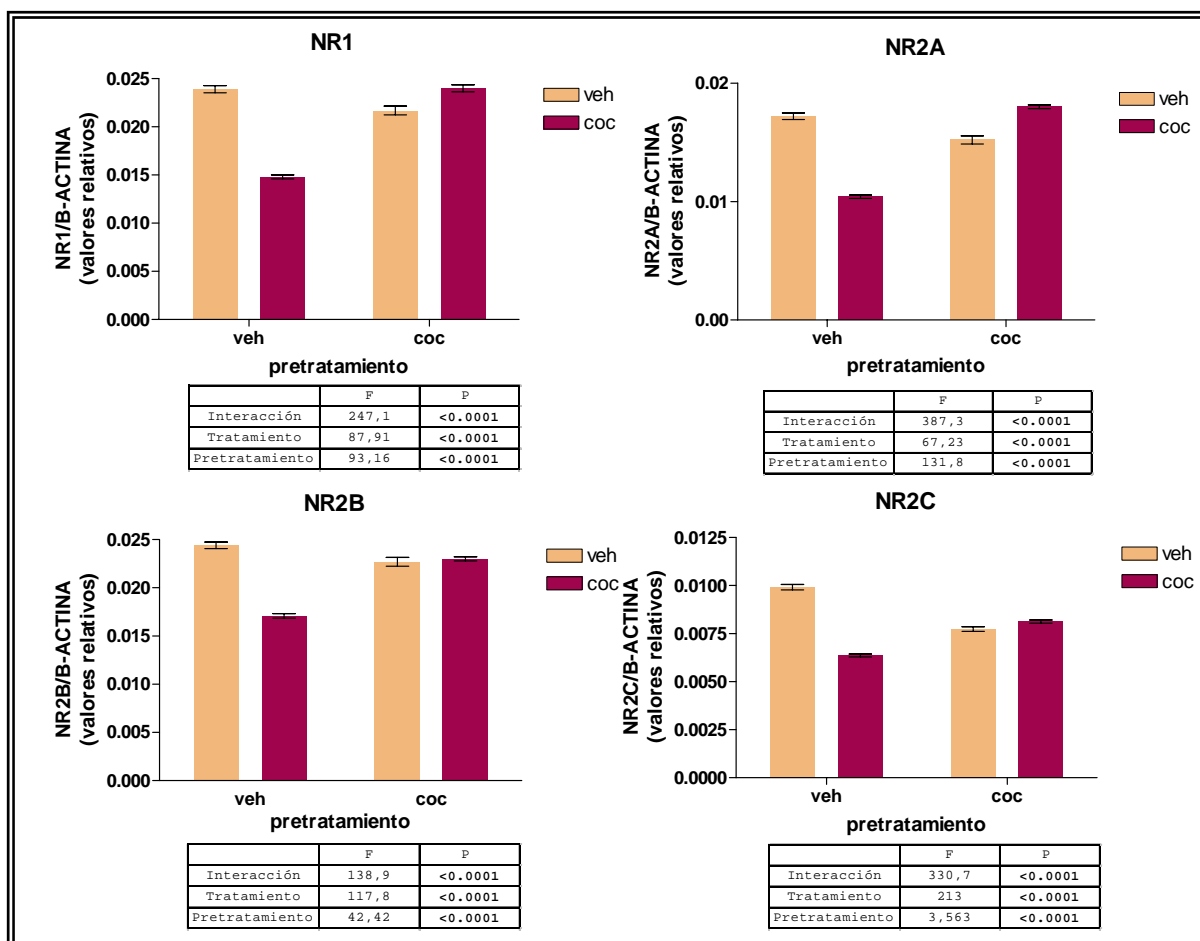
Los receptores ionotrópicos de glutamato juegan un papel significativo en la regulación de una gran variedad de actividades celulares y sinápticas, incluyendo aprendizaje y memoria, así como en la efectividad de las propiedades de las drogas de abuso.

El receptor NMDA de glutamato está compuesto por múltiples subunidades diferentes. Estas subunidades varían en cuanto a distribución y propiedades farmacológicas. El receptor NMDA está compuesto por la subunidad NR1, junto con distintas subunidades NR2.

El estudio estadístico mediante un ANOVA de dos vías, de los niveles de expresión de las cuatro subunidades del receptor NMDA en estriado (**ver figura 42**), nos muestra que todas ellas se comportan igual con los distintos tratamientos. Hay un efecto del pretratamiento inicial, y un efecto del tratamiento agudo posterior dependiente del tratamiento previo. De esta manera, los niveles de ARNm de las cuatro subunidades se ven aumentados por un pretratamiento previo con cocaína. Si después hay una administración aguda de cocaína, los niveles de ARNm disminuyen si no ha habido un pretratamiento con cocaína, y aumentan si ya hubo un tratamiento crónico con la droga.

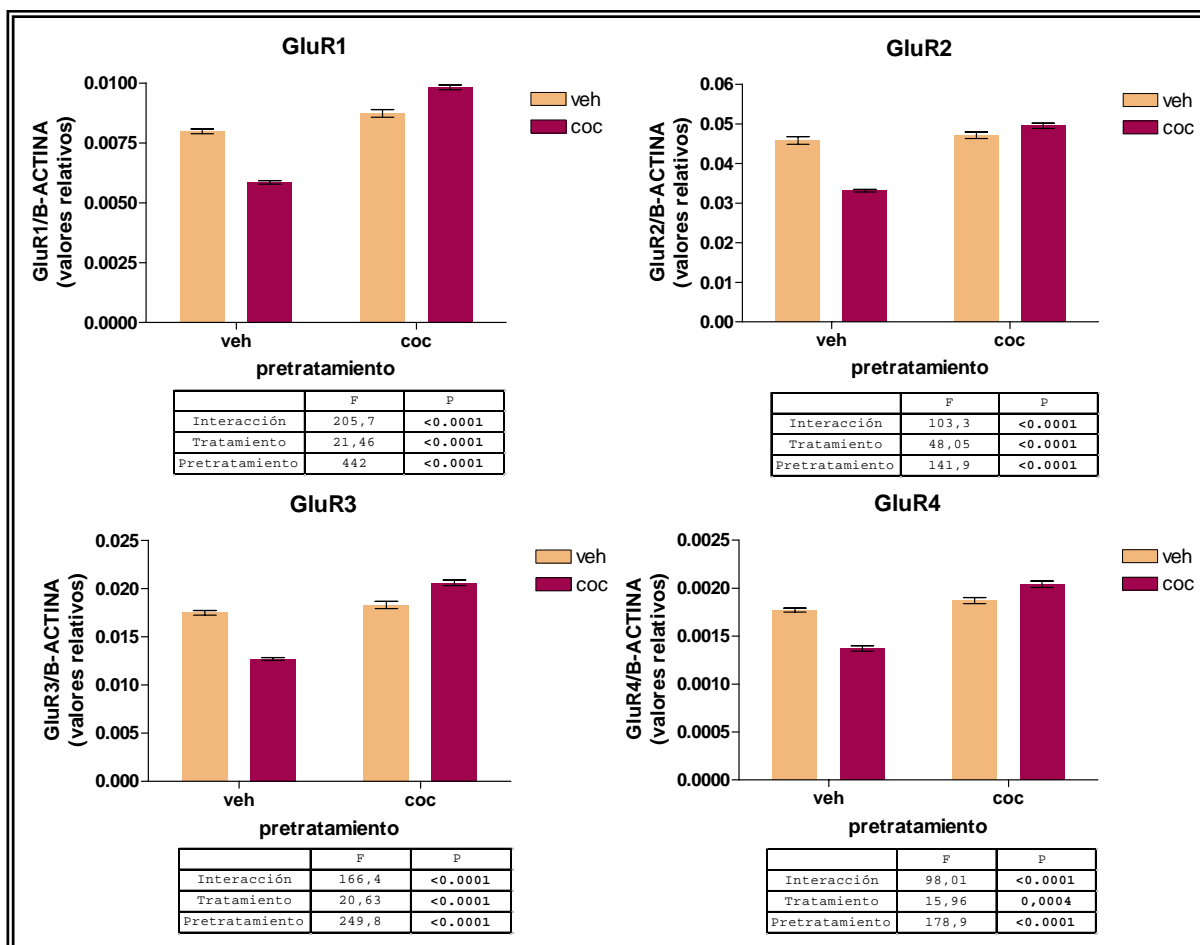
### 2.3.1.3. Receptor AMPA

El receptor AMPA también pertenece a los receptores ionotrópicos de glutamato, y al igual que el receptor NMDA, está compuesto por cuatro subunidades diferentes (GluR1-GluR4), que combinados forman receptores diferentes funcionalmente. En la literatura hay muchas evidencias de que las subunidades del receptor AMPA se alteran en respuesta a la administración repetida de cocaína.



**Figura 42.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor NMDA en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

Los niveles de ARNm de las cuatro subunidades del receptor AMPA estudiadas en estriado (**ver figura 43**) siguen el mismo patrón de expresión que las subunidades del receptor NMDA. De esta manera, el pretratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles de ARNm de las cuatro subunidades. Y, en el caso haber una exposición aguda a la droga sin que haya habido un contacto previo con la droga, los niveles de ARNm disminuyen, al contrario de lo que ocurre si ha habido un tratamiento crónico previo con la droga.



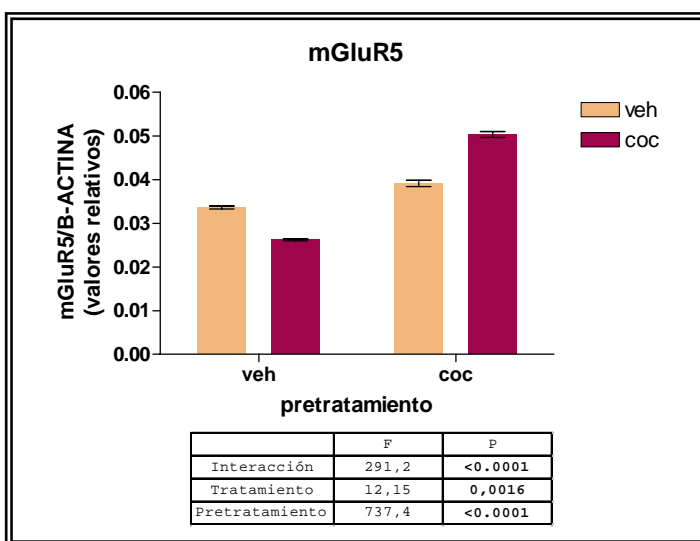
**Figura 43.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor AMPA en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.3.1.4. Receptor mGluR5

Además de los receptores ionotrópicos, el glutamato también activa receptores metabotrópicos. En este caso estudiaremos uno de los receptores del Grupo I, el mGluR5, debido a que está acoplado a la fosfolipasa C, y por tanto puede controlar el flujo de producción de 2-AG. Este receptor está localizado en el elemento postsináptico y juega un importante papel en el aprendizaje, la memoria y en la potenciación a largo plazo en el hipocampo de rata.



Los niveles de expresión de ARNm del receptor metabotrópico de glutamato (ver **figura 44**) sigue el mismo patrón de expresión que los receptores ionotrópicos de glutamato estudiados. Hay un aumento de los niveles basales del ARNm debido al pretratamiento con cocaína. Con el tratamiento agudo con cocaína estos niveles disminuyen, a no ser que haya habido un tratamiento crónico con cocaína anterior a la administración aguda de la droga.



**Figura 44.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor metabotrópico de glutamato mGluR5 en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

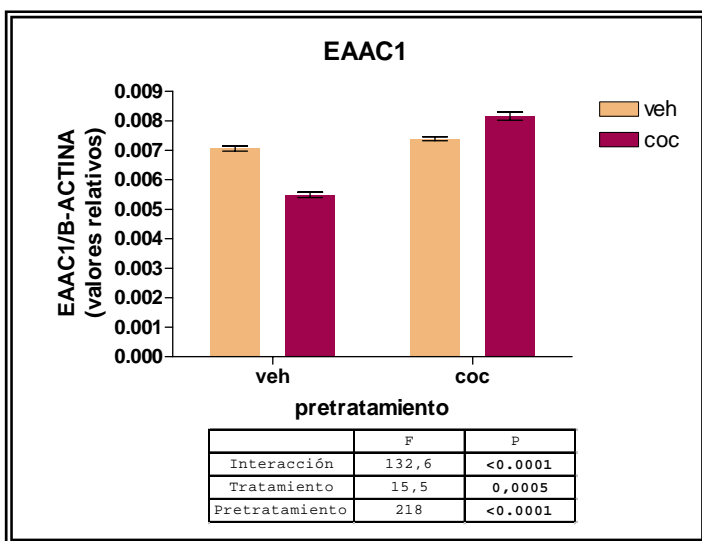
#### 2.3.1.5. Transportador

Hasta la fecha se han clonado cinco transportadores de glutamato. Su función parece ser crítica en la reducción de la concentración extracelular, potencialmente tóxica, de glutamato mediante una rápida recaptura desde los terminales nerviosos y las células gliales. En concreto, el transportador de glutamato EAAC1 es específico de ciertas neuronas y de las células de Purkinje, y es especialmente abundante en cortex, hipocampo y estriado. Se localiza tanto en el elemento presináptico como en el postsináptico.

Los niveles de expresión de ARNm del transportador de glutamato se comportan igual que el resto de componentes del sistema glutamatérgicos estudiados en estriado (ver **figura 45**). Así, el pretratamiento con cocaína aumenta los niveles basales de ARNm del transportador de glutamato. El tratamiento agudo posterior incrementa más estos niveles en



los ratones que fueron pretratados con cocaína, mientras que los niveles disminuyen si los ratones no recibieron dicho pretratamiento.

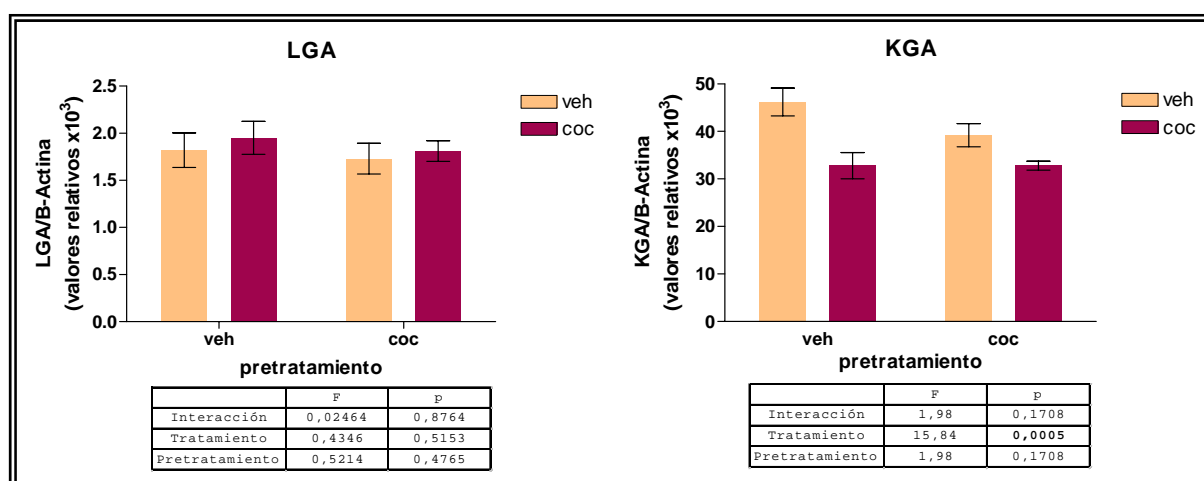


**Figura 45.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de glutamato en estriado, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.3.2. Hipocampo

#### 2.3.2.1. Síntesis

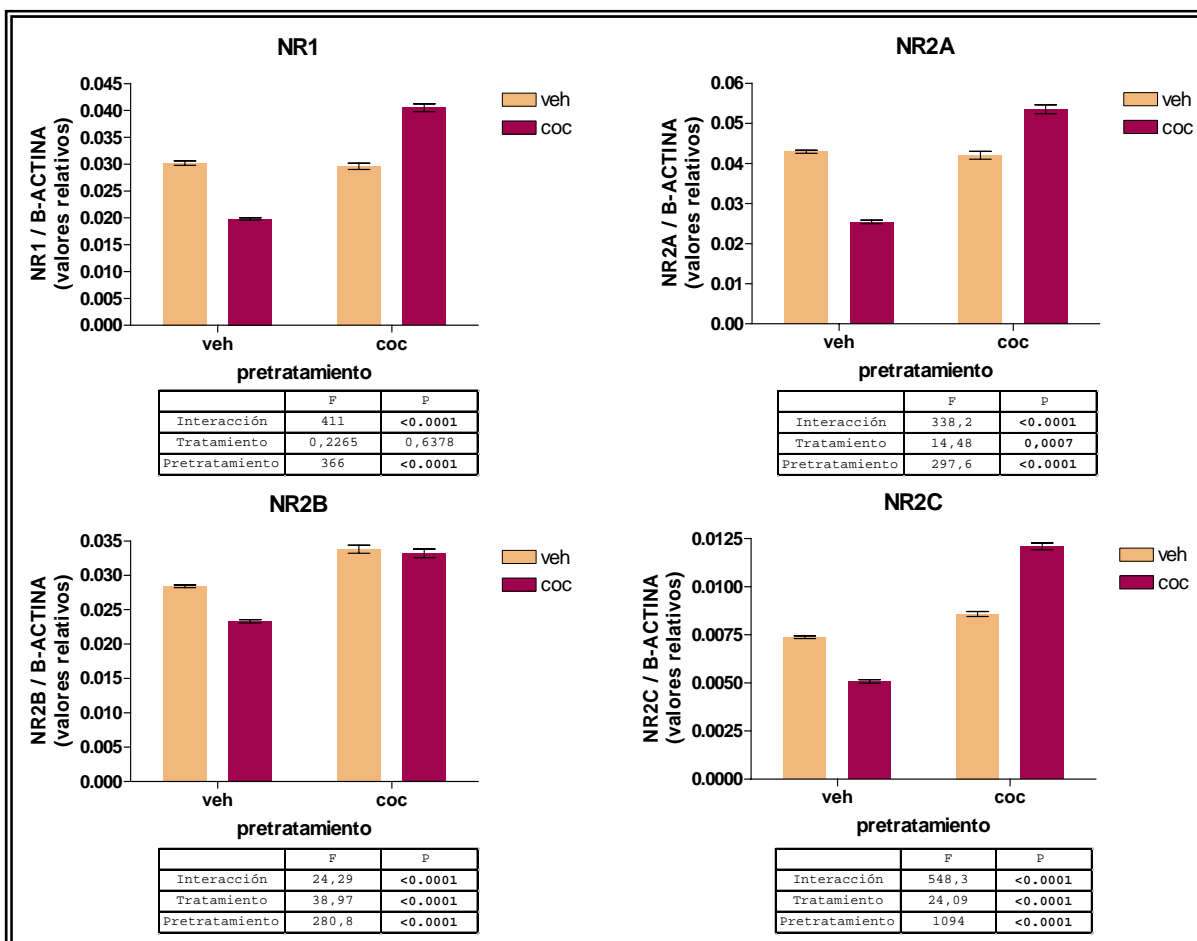
El nivel de ARNm de las isoformas de la enzima glutaminasa en hipocampo (**ver figura 46**) es diferente dependiendo de la isoenzima que estudiemos. En el caso de la LGA no se aprecia ningún efecto significativo, no hay diferencias de expresión debidas ni al tratamiento crónico, ni al agudo, con cocaína.



**Figura 46.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las dos isoformas de la enzima de síntesis del glutamato, LGA y KGA en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



Sin embargo, en el caso de la isoenzima KGA aparecen diferencias significativas entre los distintos grupos debidos al tratamiento agudo con cocaína. De esta manera, los niveles basales de ARNm de esta isoforma enzimática disminuyen con el tratamiento agudo con cocaína.



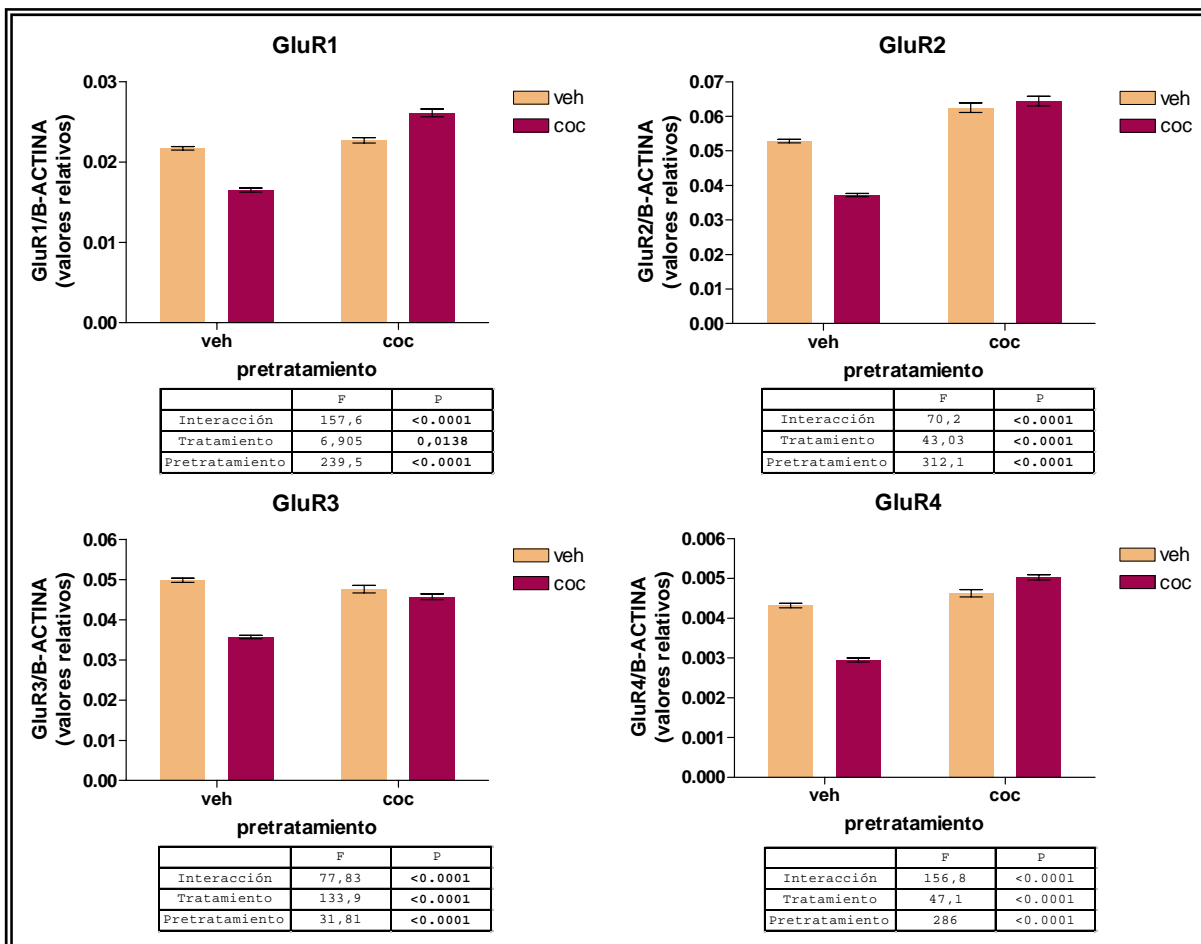
**Figura 47.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor NMDA en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.3.2.2. Receptor NMDA

Los niveles de ARNm de las distintas subunidades del receptor NMDA en hipocampo (ver figura 47) sigue el mismo patrón que en el caso de estriado, excepto las subunidades NR1 y NR2B. En el primer caso, la subunidad NR1 solo se ve afectada por el pretratamiento, de manera que el tratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles de



ARNm de la subunidad, aunque parte de este aumento es debido al producido por el tratamiento agudo. En el caso de la subunidad NR2B, hay efecto de los dos factores, y uno es dependiente de otro, de manera que además de haber un aumento de los niveles de ARNm debidos al tratamiento crónico con la cocaína, estos niveles disminuyen con el tratamiento agudo, pero de forma más robusta si no ha habido contacto previo con la droga.



**Figura 48.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor AMPA en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.3.2.3. Receptor AMPA

En este caso también hay diferentes patrones de expresión (**ver figura 48**). Las subunidades GluR1, GluR2 y GluR4, siguen el mismo patrón que en estriado:

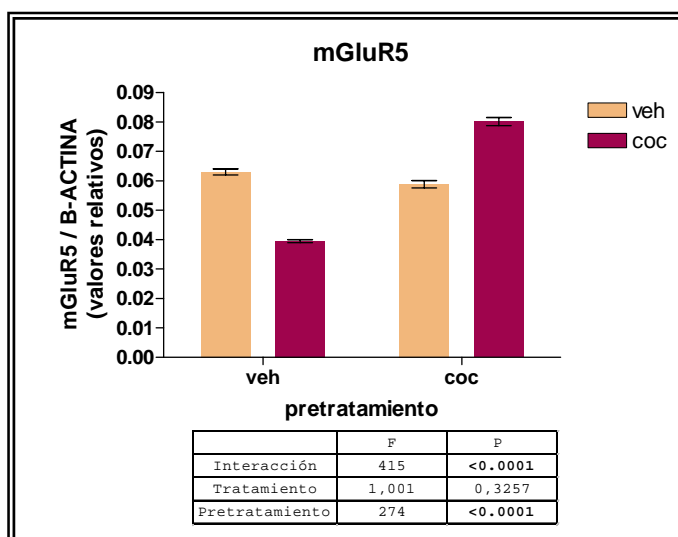


- el pretratamiento con cocaína aumenta los niveles basales de ARNm
- el tratamiento agudo con cocaína aumenta aún más dichos niveles si ha habido un pretratamiento con cocaína, en el caso de que no lo haya habido, la administración aguda disminuye el nivel de ARNm de estas subunidades

Con respecto a la subunidad GluR3, el pretratamiento ejerce el mismo efecto, elevando los niveles de ARNm, pero la administración aguda, en ambos casos aumenta dichos niveles, aunque de manera más robusta si no ha habido contacto previo con la droga.

#### 2.3.2.4. Receptor mGluR5

Los niveles de ARNm del receptor metabotrópico en hipocampo (**ver figura 49**), se ve afectado por el pretratamiento inicial, de manera que los niveles basales de ARNm de este receptor se ven aumentados con el tratamiento crónico con cocaína, sin embargo, este resultado parece dependiente de la administración aguda posterior, de manera que este aumento podría estar debido, al menos en parte al tratamiento con cocaína.



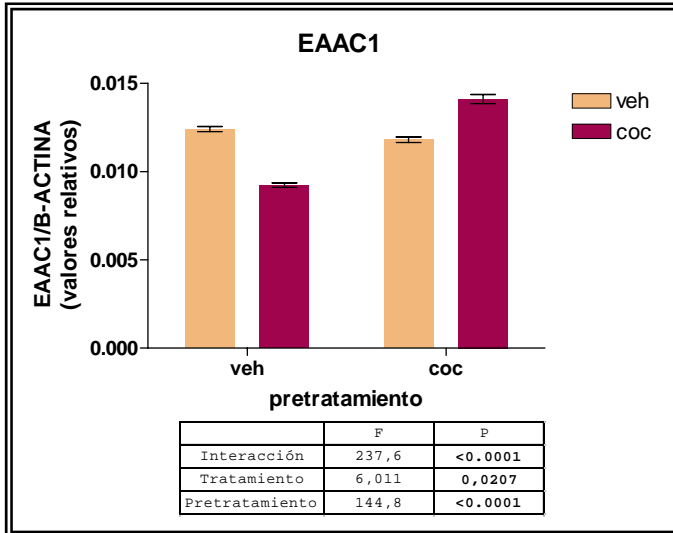
**Figura 49.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor metabotrópico de glutamato mGluR5 en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.3.2.5. Transportador

Con respecto al nivel de ARNm del transportador de glutamato en hipocampo (**ver figura 50**) sigue el mismo patrón general. Hay un aumento de los niveles de ARNm con el



tratamiento crónico con cocaína, mientras que el tratamiento agudo provoca un aumento mayor en los animales pretratados con la droga, y una disminución si el pretratamiento se realizó con vehículo.

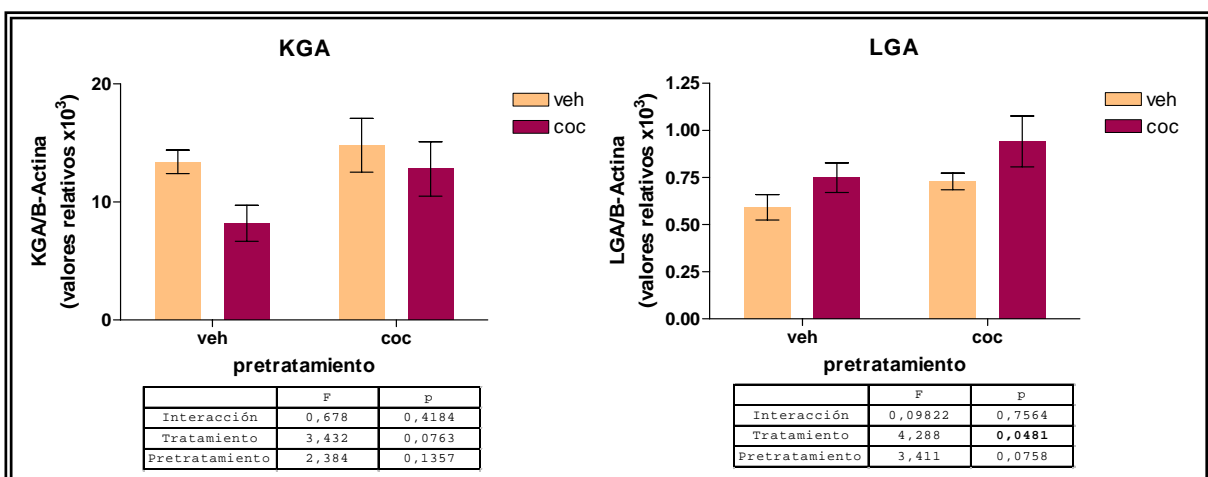


**Figura 50.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de glutamato en hipocampo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.3.3. Corteza prefrontal

#### 2.3.3.1. Síntesis

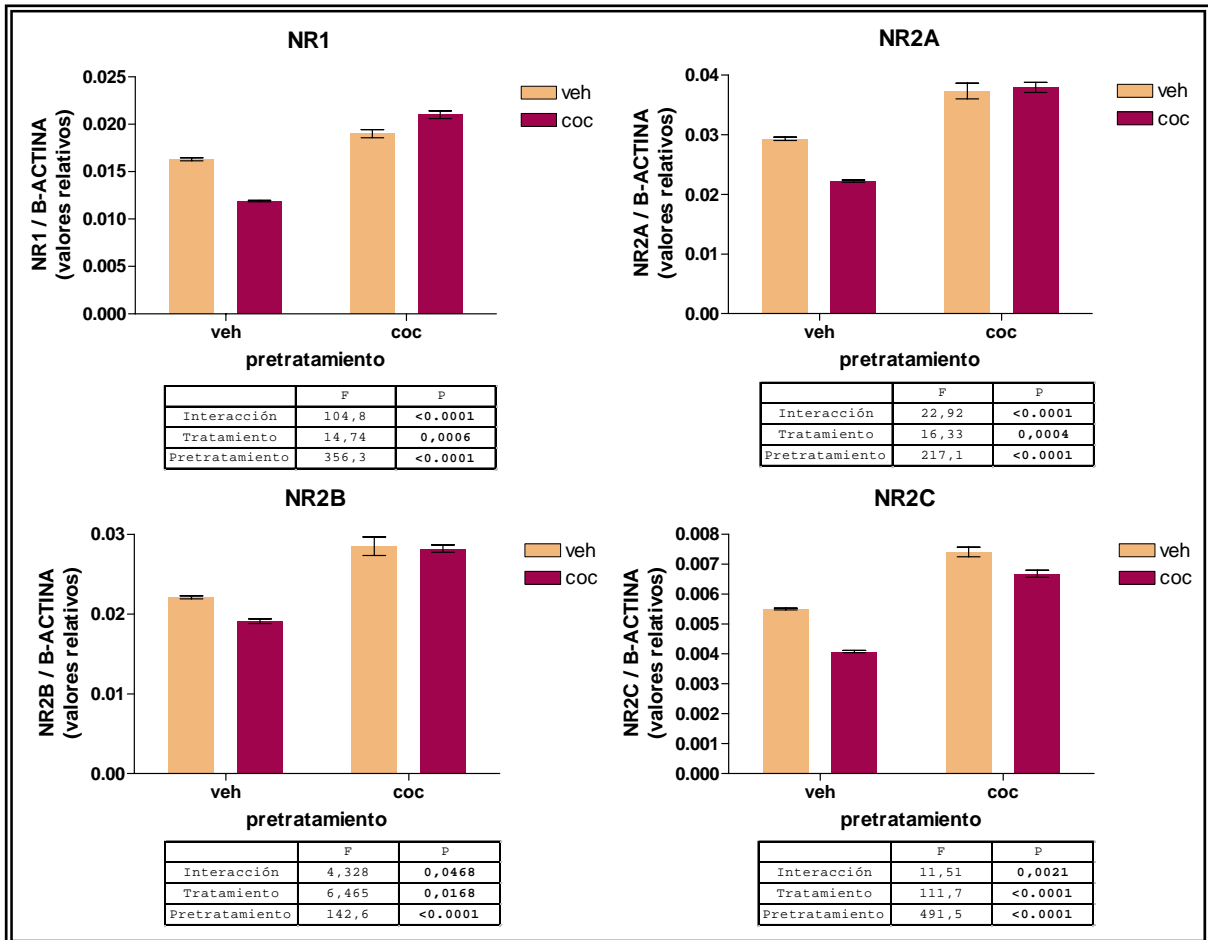
Los niveles de ARNm de las enzimas de síntesis del glutamato en la corteza prefrontal (ver figura 51) es diferente dependiendo de la isoforma que estudiemos. En el caso de la KGA no hay cambios significativos si tratamiento con cocaína.



**Figura 51.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las dos isoformas de la enzima de síntesis del glutamato, LGA y KGA en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



No obstante, en el caso de la LGA, aparecen cambios significativos en los niveles de expresión, debidos únicamente al tratamiento con cocaína, de manera que podemos decir que el tratamiento agudo con cocaína aumenta los niveles de esta isoforma.



**Figura 52.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor NMDA en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

En el hipocampo, la expresión de ARNm de las distintas subunidades del receptor de glutamato NMDA (ver figura 52) es diferente. El nivel de ARNm de la subunidad NR1 aumenta con el pretratamiento con cocaína, mientras que el tratamiento agudo provoca un aumento si ha habido pretratamiento previo con cocaína, y una disminución si no lo ha



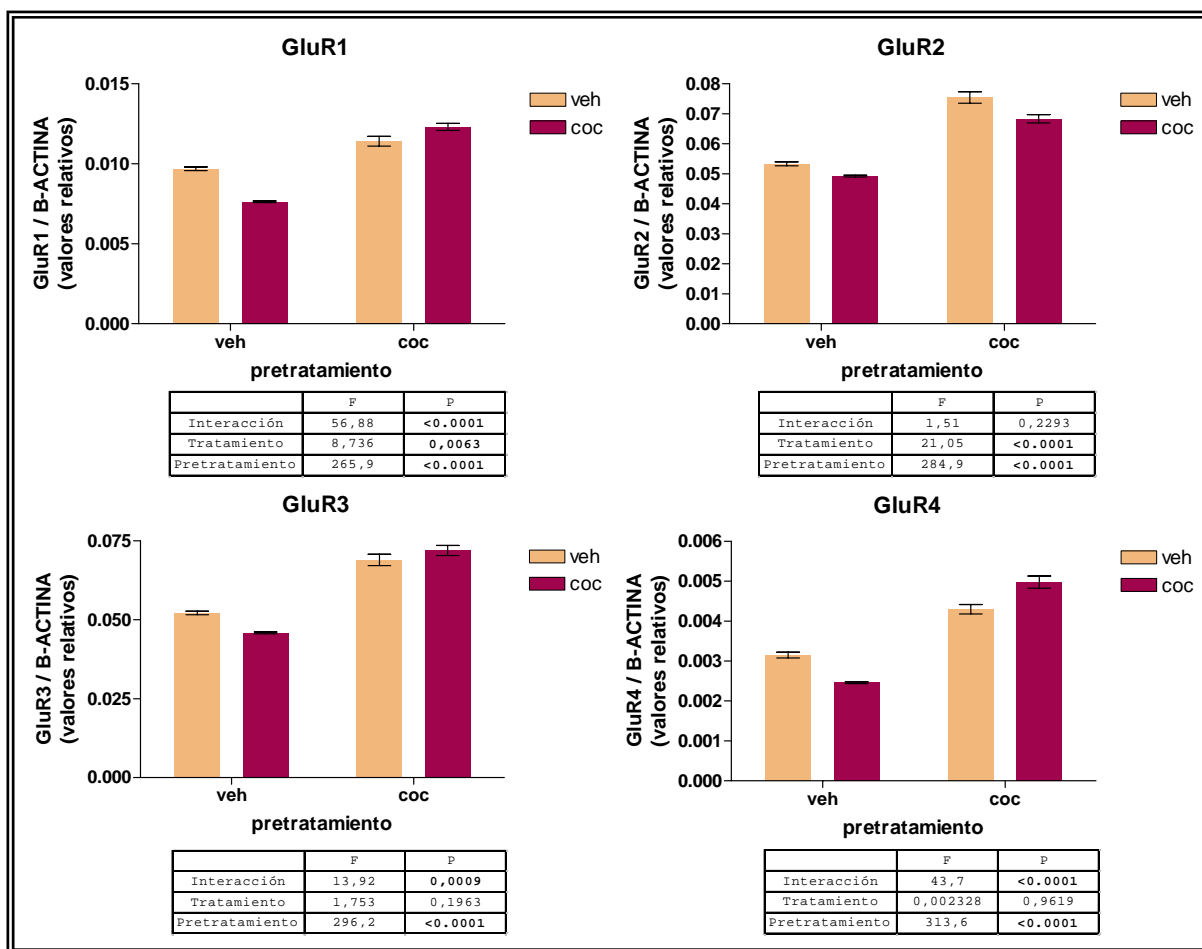
habido. En el resto de las subunidades, el efecto del pretratamiento con cocaína es similar a la subunidad NR1, sin embargo el efecto del tratamiento agudo disminuye en ambos casos los niveles de ARNm, siendo la disminución mayor en el caso de no haber habido una administración previa de cocaína.

#### 2.3.3.3. Receptor AMPA

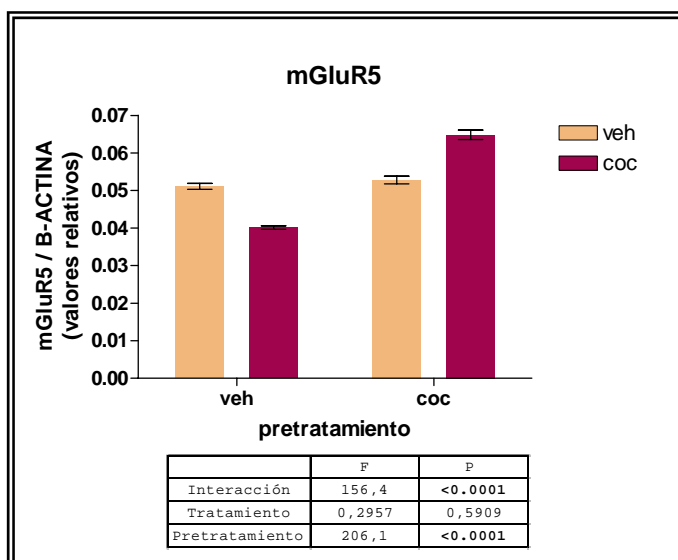
En cuanto a la expresión de ARNm de las subunidades que componen el receptor ionotrópico AMPA en hipocampo (**ver figura 53**), hay varios efectos del tratamiento crónico y del tratamiento agudo dependiendo de la subunidad de la que hablemos. Con respecto a la subunidad GluR1, hay un efecto del tratamiento, del pretratamiento, y una interacción entre los dos factores. Esto es, el pretratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles de ARNm de esta subunidad, a la vez que una administración aguda de cocaína posterior a los pretratamientos provoca una elevación de los niveles de ARNm si ha habido un contacto previo con la droga, y una disminución si no la ha habido.

En cuanto a la subunidad GluR2, el efecto del tratamiento agudo es independiente del pretratamiento, de manera que un tratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles basales de ARNm, mientras que el tratamiento agudo posterior los disminuye, independientemente del pretratamiento que hayan tenido previamente.

Por último, los niveles de expresión de las subunidades GluR3 y GluR4 solo se ven afectadas por el pretratamiento, y al igual que en el resto de componentes del sistema glutamatérgico, los niveles de ARNm de estas subunidades se ven elevados por una administración crónica con cocaína. Pero en este caso no influye el tratamiento agudo posterior.



**Figura 53.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor AMPA en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 54.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor metabotrópico de glutamato mGluR5 en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

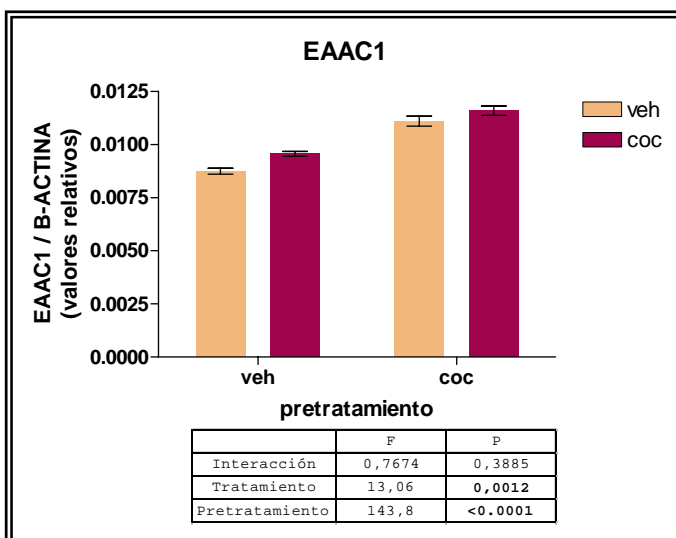


#### 2.3.3.4. Receptor mGluR5

El efecto de los distintos tratamientos sobre el receptor metabotrópico de glutamato en hipocampo (**ver figura 54**), es debido al pretratamiento recibido. Así, los niveles de ARNm medidos por PCR a tiempo real aparecen elevados en los grupos tratados con cocaína de manera crónica, en comparación con los que fueron tratados con vehículo.

#### 2.3.3.5. Transportador

En el caso del nivel de expresión de ARNm del transportador de glutamato en el hipocampo (**ver figura 55**), el análisis estadístico nos indica un efecto del pretratamiento y un efecto del tratamiento agudo posterior, independiente del primero. Es decir, los niveles de ARNm aumentan con el tratamiento crónico con cocaína. Además, una exposición aguda a la droga provoca un aumento extra de estos niveles de ARNm.

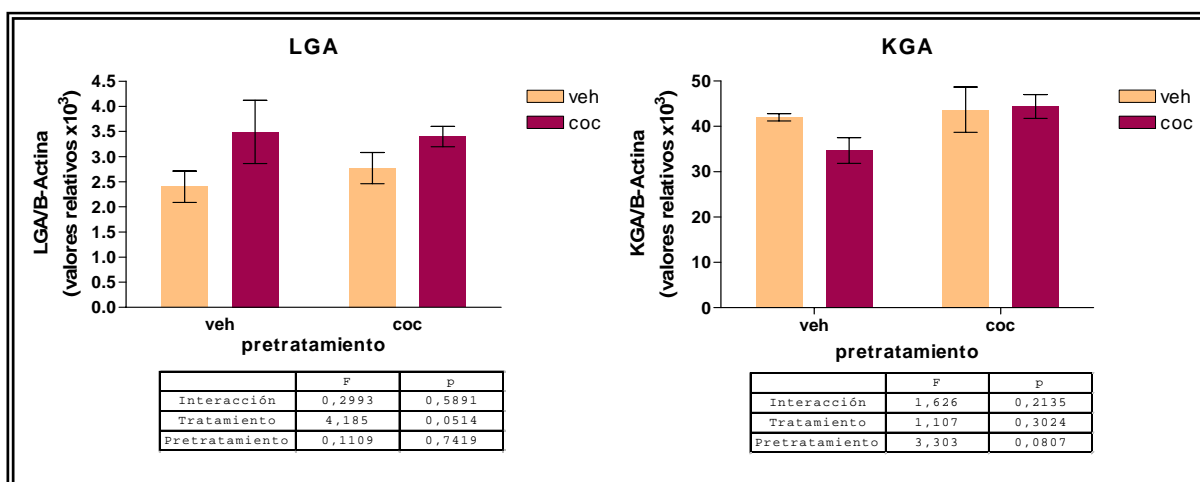


**Figura 55.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de glutamato en corteza prefrontal, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.3.4. **Cerebelo**

#### 2.3.4.1. Síntesis

En el caso de las dos isoformas de la enzima de síntesis del glutamato en el cerebelo (**ver figura 56**) no aparecen cambios significativos debidos a los diferentes tipos de administración con cocaína.



**Figura 56.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las dos isoformas de la enzima de síntesis del glutamato, LGA y KGA en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.3.4.2. Receptor NMDA

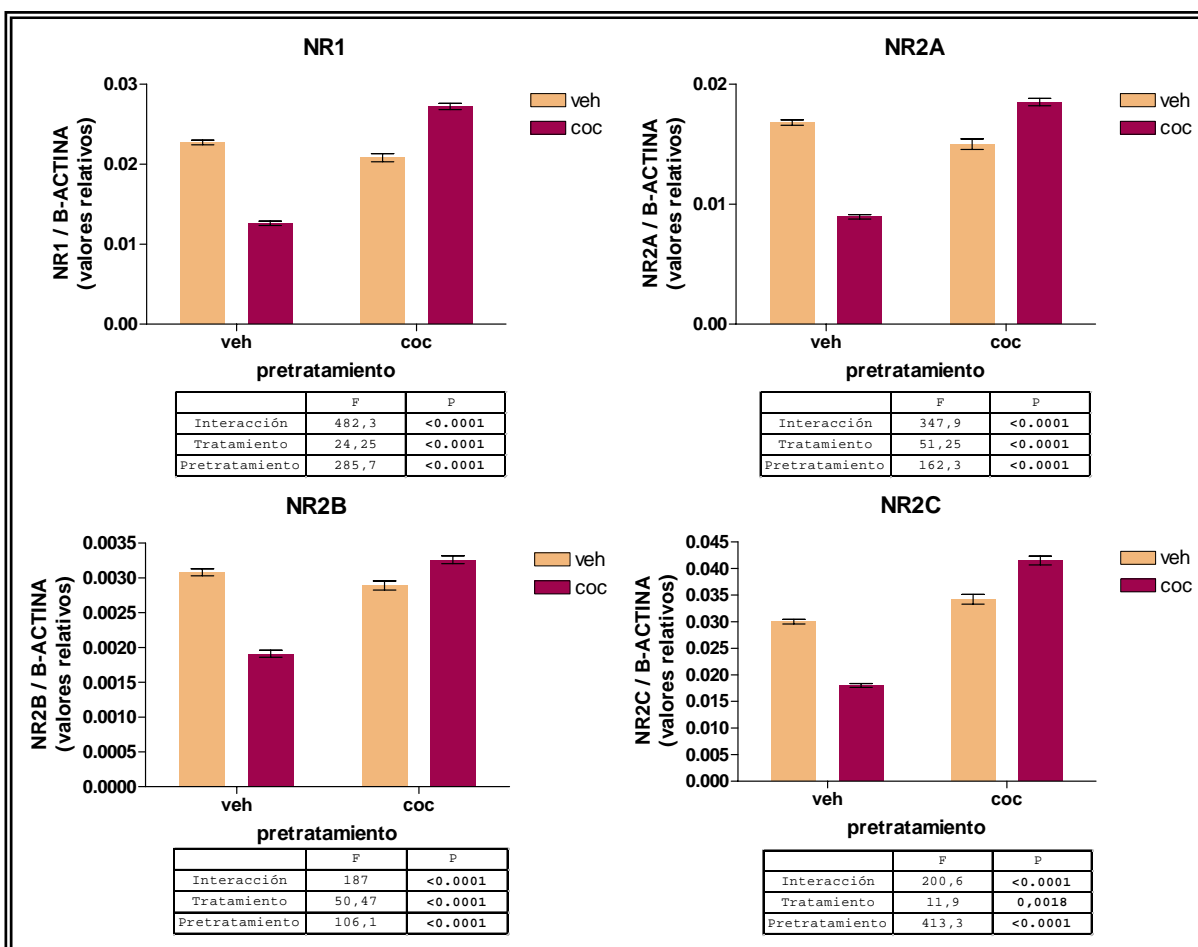
Con respecto a los niveles de ARNm de las distintas subunidades del receptor NMDA para glutamato en cerebelo (**ver figura 57**) podemos apreciar que hay un efecto, similar para todas las subunidades, del tratamiento, del pretratamiento, y una interacción entre los dos factores. Esto es, el pretratamiento crónico con cocaína aumenta los niveles de ARNm todas las subunidades, a la vez que una administración aguda de cocaína posterior a los pretratamientos provoca una elevación de los niveles de ARNm si ha habido un contacto previo con la droga, y una disminución si no la ha habido previamente.

#### 2.3.4.3. Receptor AMPA

Los niveles de ARNm de las distintas subunidades del receptor ionotrópico tipo AMPA, en cerebelo (**ver figura 58**), se ven afectado por el pretratamiento inicial, de manera que los niveles basales de los ARNm de las subunidades este receptor se ven aumentados con el tratamiento crónico con cocaína. Sin embargo, este resultado parece dependiente de la



administración aguda posterior, de manera que este aumento podría estar debido, al menos en parte al tratamiento con cocaína.



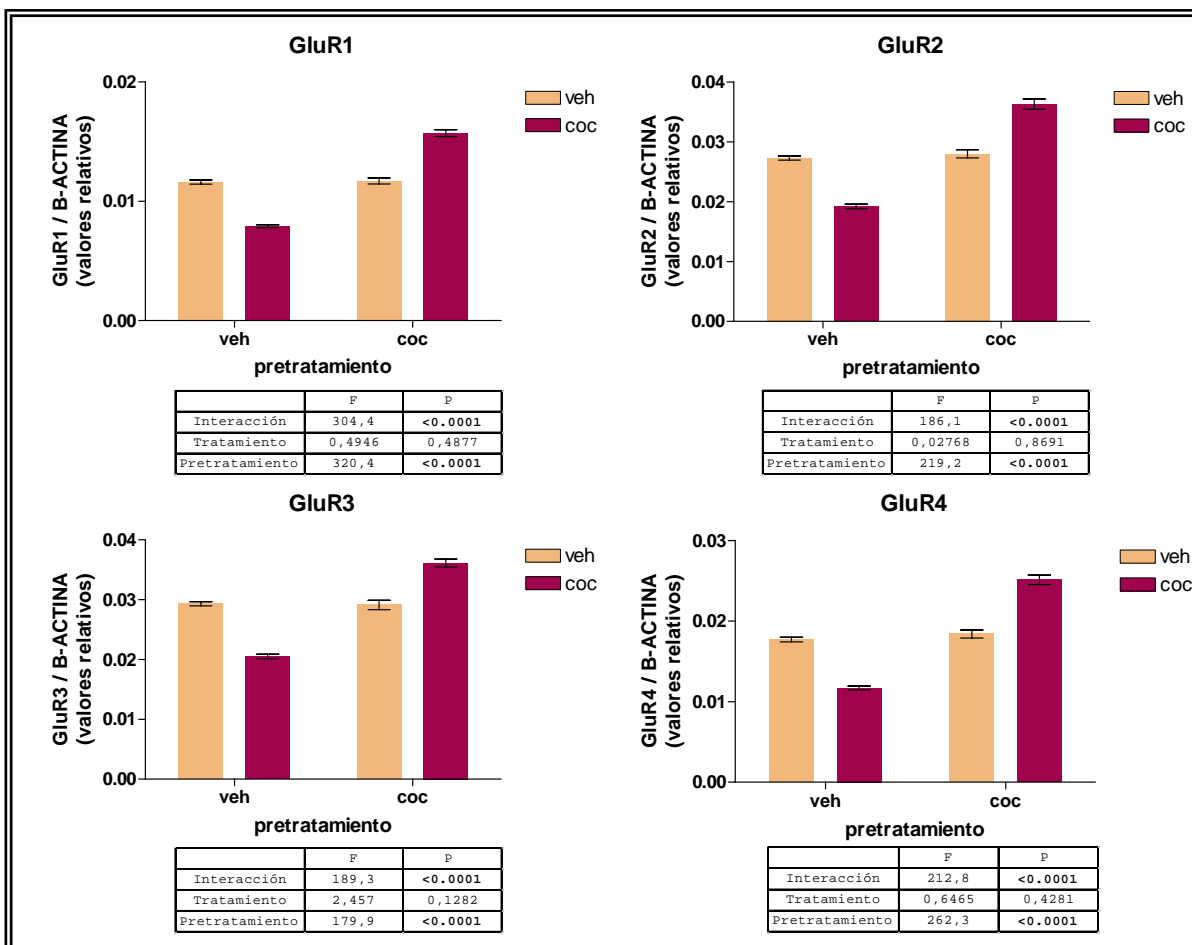
**Figura 57.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor NMDA en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.3.4.4. Receptor mGluR5

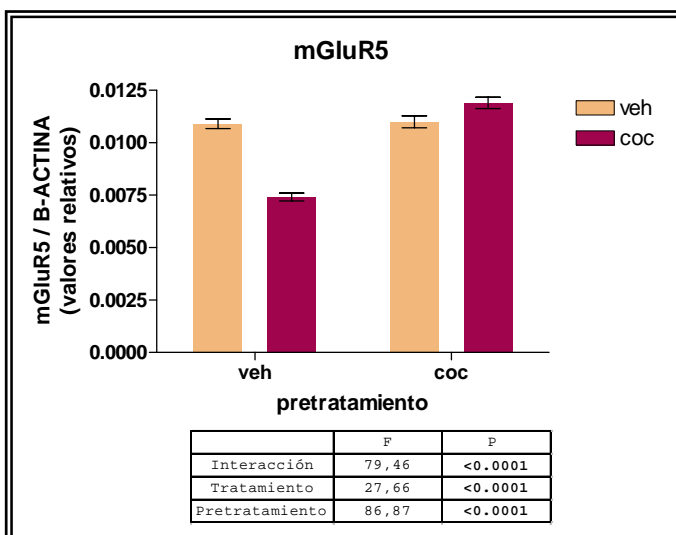
Con respecto al nivel de ARNm del receptor metabotrópico de glutamato en el cerebelo (ver figura 59) se aprecian cambios significativos debidos al pretratamiento inicial, al tratamiento posterior, y además, un efecto es dependiente del otro ya que aparece interacción. Hay un aumento de los niveles de ARNm con el tratamiento crónico con



cocaína, mientras que el tratamiento agudo provoca un aumento mayor en los animales pretratados con la droga, y una disminución si el pretratamiento se realizó con vehículo.



**Figura 58.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm de las cuatro subunidades del receptor AMPA en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

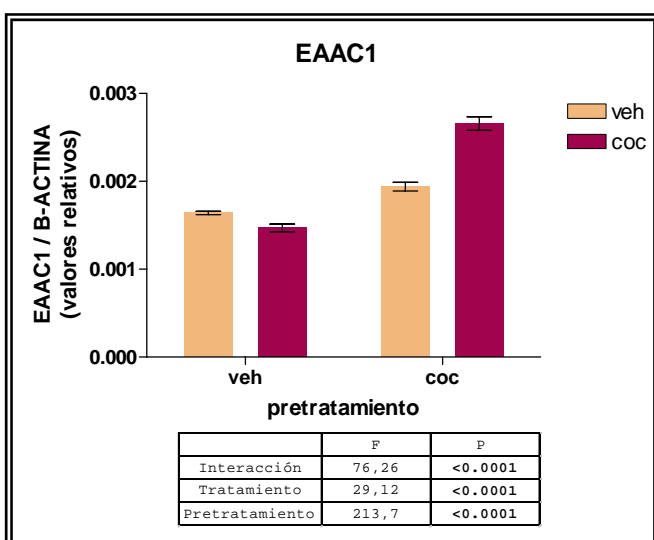


**Figura 59.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del receptor metabotrópico de glutamato mGluR5 en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



### 2.3.4.5. Transportador

En el caso del nivel de expresión de ARNm del transportador de glutamato en cerebelo (**ver figura 60**) vemos un efecto similar al anterior: cambios significativos debidos al pretratamiento inicial, al tratamiento posterior, y además, un efecto es dependiente del otro ya que aparece interacción. Hay un aumento de los niveles de ARNm con el tratamiento crónico con cocaína, mientras que el tratamiento agudo provoca un aumento mayor en los animales pretratados con la droga, y una disminución si el pretratamiento se realizó con vehículo.



**Figura 60.** Efecto agudo del vehículo y la cocaína sobre los niveles del ARNm del transportador de glutamato en cerebelo, obtenidos de ratones pretratados con vehículo y cocaína (5 días de inyecciones diarias, seguido de 7 días de tratamiento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

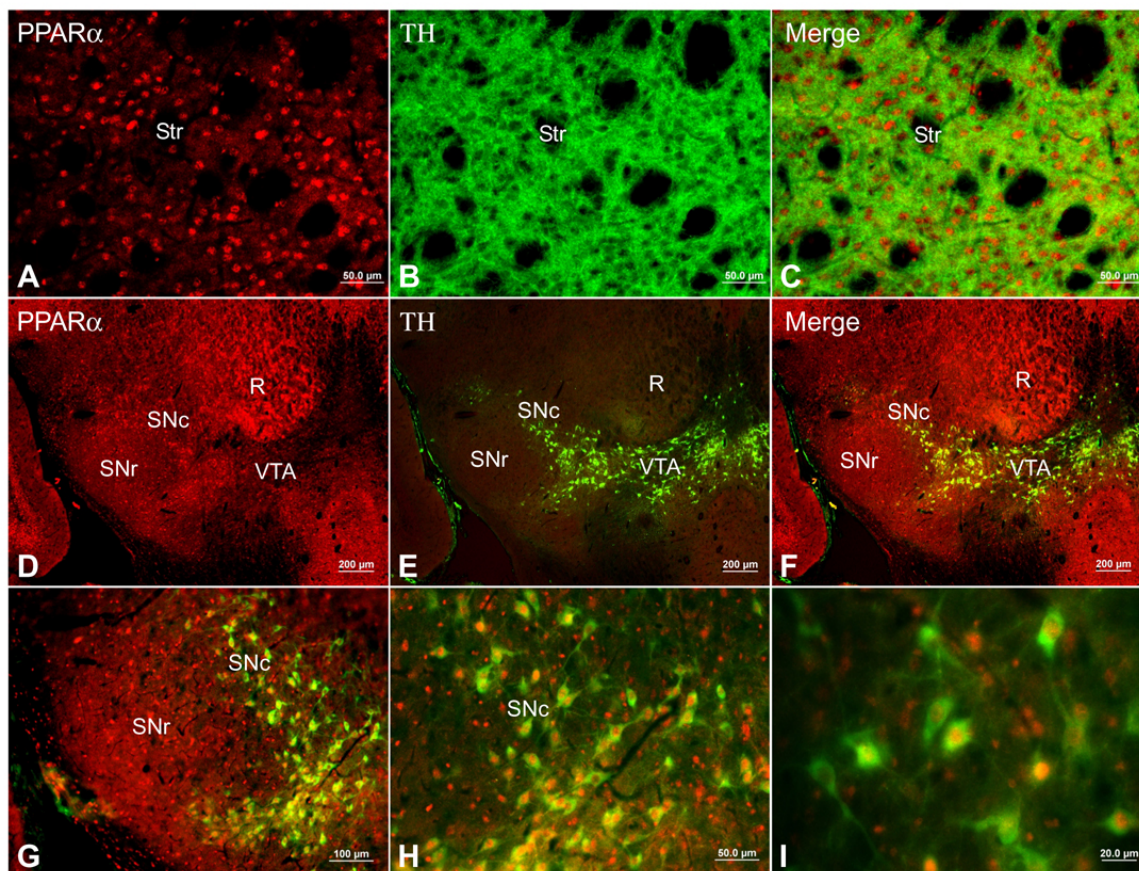
## II. ACCIONES DE LA COCAÍNA EN RATONES DEFICIENTES DEL RECEPTOR PPAR $\alpha$ .

En este segundo conjunto de experimentos comportamentales, estudiaremos la implicación del receptor PPAR $\alpha$  en los fenómenos de adicción, mediante la utilización de ratones KO para el gen de este receptor.

### 1. INMUNOHISTOQUÍMICA



Se realizó una inmunohistoquímica para ver la localización del receptor  $PPAR\alpha$  en las neuronas dopaminérgicas del sistema de recompensa en ratones CD1 (ver **figura 61**). Aparece una colocalización de  $PPAR\alpha$  y la enzima de síntesis de la dopamina, TH, en el estriado y en el ATV. Debido a esto estudiamos la hipótesis de que la OEA o  $PPAR\alpha$  podrían modificar la sensibilización/condicionamiento a cocaína.



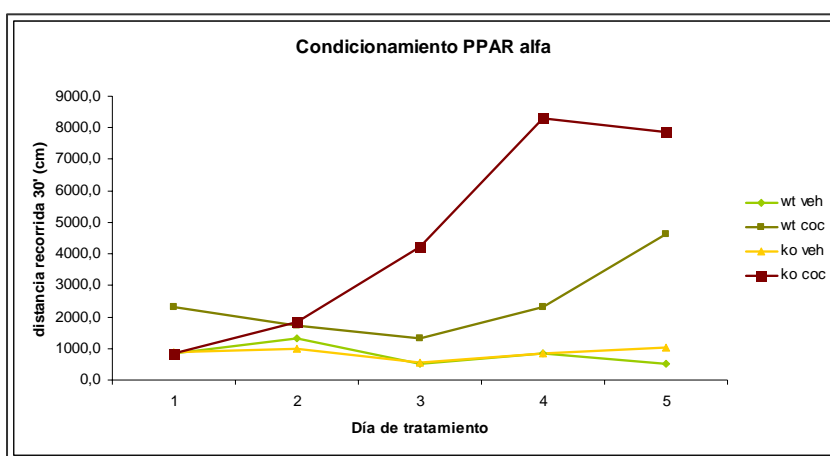
**Figura 61.** La inmunofluorescencia para  $PPAR\alpha$  (rojo) muestra una relación anatómica con la distribución dopaminérgica (verde) en la estriado (A-C) y sustancia nigra (D-I). En las fotos A-C, las células marcadas con anti- $PPAR\alpha$  están localizadas extensamente en el estriado y rodeadas por fibras TH<sup>+</sup>. En las fotos D-I, los núcleos celulares marcados con anti- $PPAR\alpha$  colocalizan con las neuronas dopaminérgicas (TH<sup>+</sup>) en la parte compacta de la sustancia nigra y en ATV (G-I). La escala está incluida en cada imagen. Abreviaturas:  $PPAR\alpha$ , receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\alpha$ ; R, núcleo rojo; SNc, sustancia nigra, pars compacta; SNr, sustancia nigra, pars reticulata; Str, estriado; TH, tirosina hidroxilasa; VTA, área tegmental ventral.



## 2. RESULTADOS COMPORTAMENTALES

### 2.1. Condicionamiento inducido por cocaína.

Se siguió el mismo programa de cinco días de tratamiento con vehículo y cocaína (20 mg/kg), que el seguido para la cepa C57. En este caso, hay cuatro grupos experimentales, animales wild-type tratados con vehículo o con cocaína, y animales KO para PPAR $\alpha$ , tratados con vehículo y cocaína. En este caso (ver **figura 62**), los dos grupos tratados con cocaína se sensibilizan. En la gráfica no se ha puesto la significación porque perdía claridad, pero la significación es visible. En conclusión, la actividad locomotora aumenta con la administración de droga en los dos genotipos, en comparación con los grupos tratados con vehículo. Además, dentro de cada genotipo, el efecto de la cocaína en el día cinco es mucho mayor que el primer día de programa.



**Figura 62.** Efecto de la cocaína (20 mg/kg) sobre la distancia recorrida en ratones de la cepa C57 (WT) y en ratones KO para el receptor PPAR $\alpha$ , durante cinco días consecutivos. Se compara, por genotipos, el efecto de la cocaína con respecto al vehículo en el mismo día, y el efecto de la cocaína el primer y último día. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

### 2.2. Locomoción condicionada inducida por cocaína.

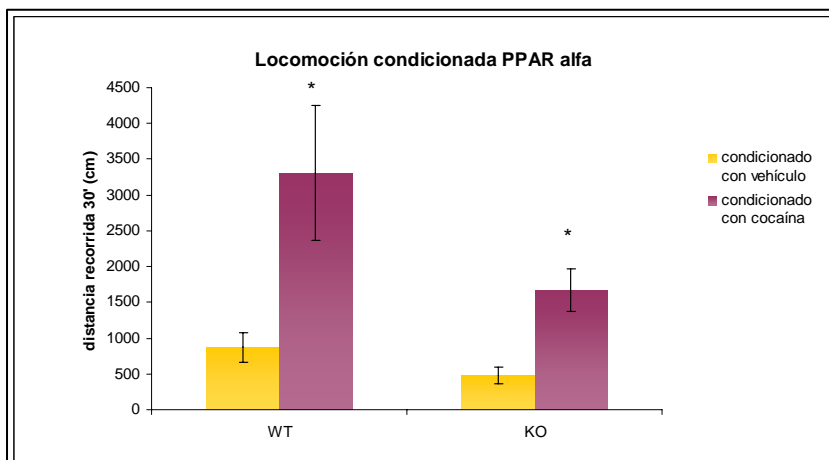
Cinco días después del condicionamiento, sin que los animales volvieran a recibir ninguna dosis de cocaína, se volvió a ensayar el test del campo abierto con estos animales, y todos los grupos recibieron vehículo. Los animales que habían sido condicionados con



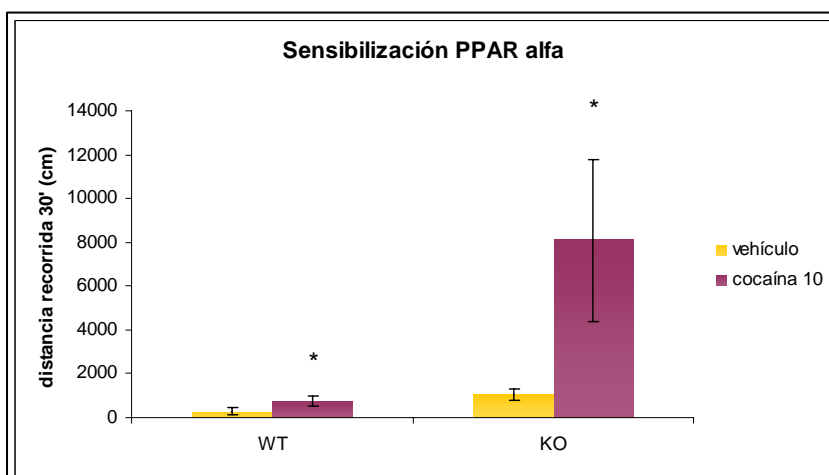
cocaína mostraron (ver **figura 63**) un aumento de la actividad locomotora, en comparación con los animales del mismo genotipo que habían sido condicionados con vehículo.

### 2.3.Sensibilización locomotora inducida por cocaína.

Al día siguiente del experimento anterior, los mismos grupos animales fueron tratados, con vehículo o con cocaína (10 mg/kg), según hubieran sufrido el condicionamiento inicial. De esta manera (ver **figura 64**), en los dos genotipos, los animales que habían sido condicionados con cocaína muestran una fuerte activación locomotora en comparación con los animales tratados con vehículo, aun siendo la dosis la mitad que en el condicionamiento. De esta manera, los dos genotipos muestran de manera normal la sensibilización locomotora inducida por cocaína.



**Figura 62.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones de la cepa C57 (WT) y ratones KO para PPAR $\alpha$ , cuando se ensaya de nuevo el campo abierto cinco días después de la última inyección, y tratando a los dos grupos con vehículo. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).



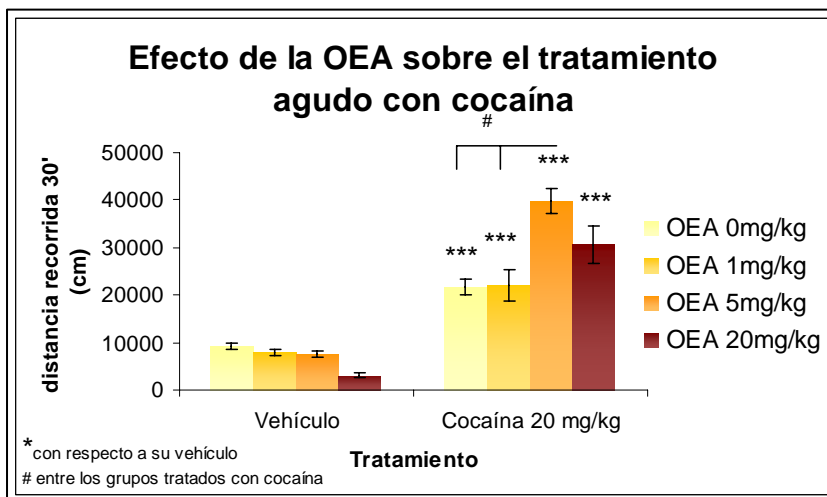
**Figura 64.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones de la cepa C57 cuando se ensaya de nuevo el campo abierto seis días después de la última inyección, y tratando, en este caso, a un grupo con vehículo y a otro con cocaína a una dosis de 10 mg/kg. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).



## 2.4.Efecto de la OEA sobre el tratamiento agudo con cocaína.

De los experimentos comportamentales con los animales KO para el gen del receptor PPAR $\alpha$ , podríamos deducir que el receptor de la OEA no está implicado en los procesos de sensibilización, ni por tanto en la adicción a cocaína. Sin embargo, no podemos concluir que la OEA no tenga un papel en estos procesos, ya que puede actuar sobre otros receptores que no sean el PPAR $\alpha$ .

Para ver el papel de la OEA en estos procesos ensayaremos el test del campo abierto con ratones de la cepa C57, haciendo distintas combinaciones de OEA y cocaína. Así, el primer experimento de este grupo consistió en la administración aguda de cocaína (20 mg/kg) junto con tres dosis diferentes de cocaína (1, 5 y 20 mg/kg). Como resultado (ver **figura 65**), todos los grupos tratados con cocaína más OEA aumentaron su actividad locomotora, con respecto a los grupos tratados solo con OEA. Además, se ve un aumento significativo de la distancia recorrida en los ratones que fueron tratados con cocaína, más la dosis de 5 mg/kg de OEA. Esta será la dosis de OEA utilizada en el resto de experimentos.

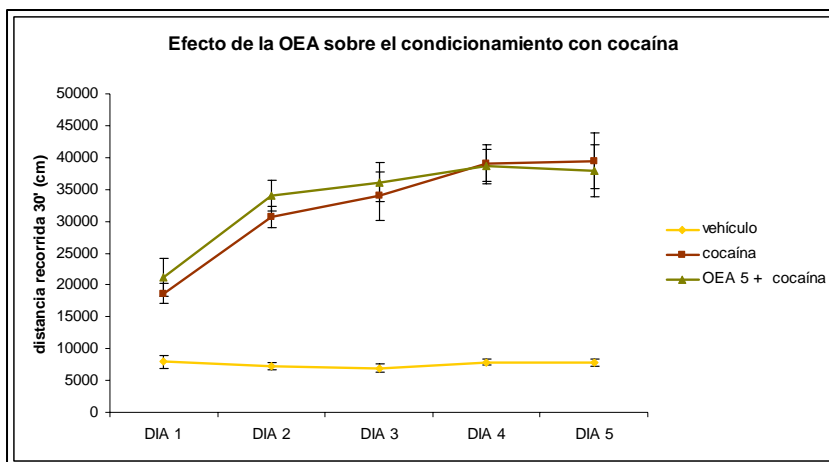


**Figura 65.** Efecto de distintas dosis de OEA (0, 1, 5 y 20 mg/kg) sobre la acción de la cocaína administrada de forma aguda. Los ratones de la cepa C57 fueron tratados primero con las distintas dosis de OEA y después recibieron vehículo o cocaína (20 mg/kg).



## 2.5. Efecto de la OEA sobre el condicionamiento locomotor inducido con cocaína.

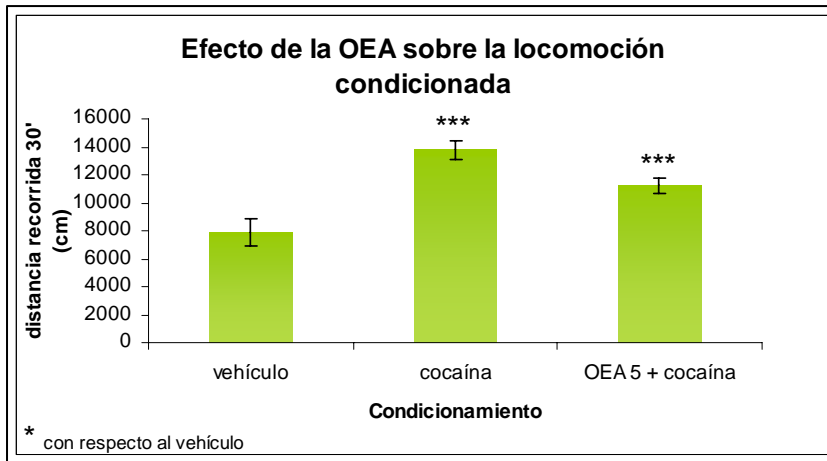
En este caso, el condicionamiento (ver **figura 66**) se lleva a cabo con tres tratamientos: vehículo, cocaína (20 mg/kg) y cocaína más OEA (5 mg/kg). En la gráfica podemos ver, que los dos grupos que llevan cocaína tienen un aumento de la actividad locomotora significativo con respecto al grupo tratado con vehículo. Además, vemos que tanto con OEA como sin ella, el aumento en la locomoción es similar, y se ve claramente el incremento a lo largo del programa de cinco días. Es decir, la OEA no varía la sensibilización inducida por cocaína.



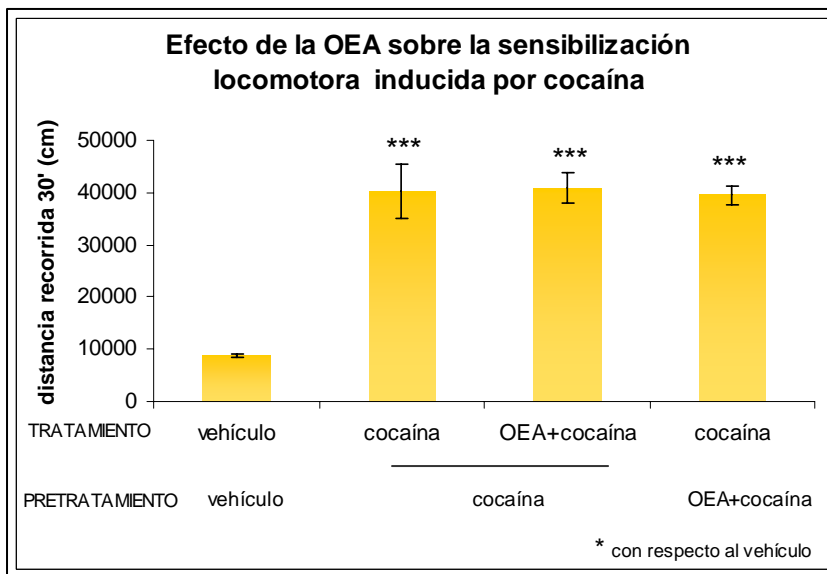
**Figura 66.** Efecto de la OEA (5mg/kg) en el aumento de la actividad locomotora inducido por cocaína (20 mg/kg). Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

## 2.6. Efecto de la OEA sobre la locomoción condicionada inducida por cocaína.

En este experimento (ver **figura 67**), llevado a cabo de manera similar que con las cepas anteriores, se ensaya el test del campo abierto cinco días después de la última dosis de condicionamiento, y a los tres grupos se les administra vehículo. Los dos grupos que habían sido condicionados con cocaína, y con cocaína más OEA, muestran un aumento de la actividad locomotora con respecto al grupo condicionado con vehículo. En ambos casos, aparece una locomoción condicionada.



**Figura 67.** Efecto de la OEA (5mg/kg) sobre la locomoción condicionada. El primer grupo fue tratado durante cinco días con vehículo, el segundo con cocaína, y el tercer grupo con cocaína junto con OEA. Se mide la distancia recorrida cinco días después de la última inyección, tratando a todos los grupos con vehículo. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).



**Figura 68.** Efecto de la OEA (5 mg/kg) sobre la sensibilización locomotora inducida por cocaína, tanto administrada junto con cocaína durante el condicionamiento, como administrada sola seis días después de la última inyección. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

## 2.7.Efecto de la OEA sobre la sensibilización locomotora inducida por cocaína.

Para ensayar el papel de la OEA sobre la sensibilización locomotora a largo plazo, se utilizan los mismos ratones que habíamos condicionado con vehículo, cocaína y cocaína más OEA. En este caso (ver **figura 68**), seis días después de la última inyección del condicionamiento, los animales que habían sido condicionados con vehículo recibieron vehículo, los animales condicionados con cocaína recibieron o cocaína o cocaína junto OEA, y los animales condicionados con cocaína más OEA, recibieron cocaína. Los dos grupos que habían sido condicionados con cocaína, y el grupo que había sido condicionado con cocaína junto con OEA, mostraron un aumento significativo de la actividad locomotora



en comparación con el grupo vehículo. Es decir, la OEA no varía la acción de la cocaína sobre la sensibilización locomotora.

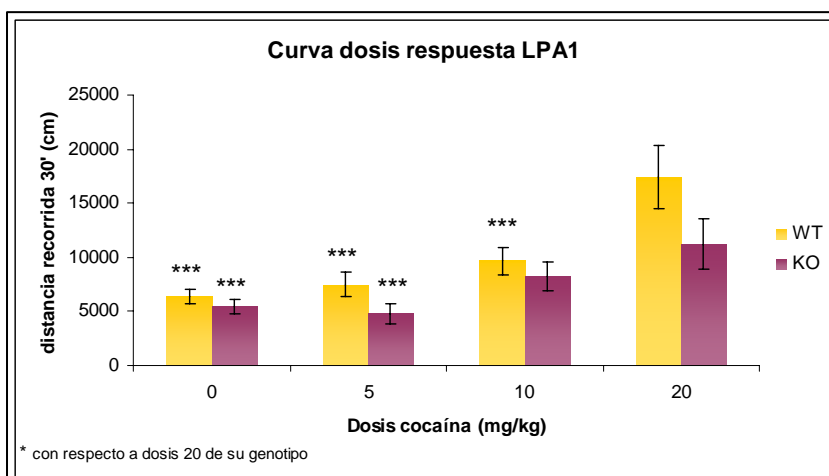
### III. ACCIONES DE LA COCAÍNA EN RATONES DEFICIENTES DEL RECEPTOR LPA1.

En este tercer conjunto de experimentos comportamentales, estudiaremos la implicación del receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1 en los fenómenos de adicción, mediante la utilización de ratones KO para el gen de este receptor.

#### 1. RESULTADOS COMPORTAMENTALES

##### 1.1. Curva dosis-respuesta a cocaína.

En un primer paso, realizamos una curva dosis-respuesta (ver **figura 69**) tanto en ratones C57, que consideraremos como grupo wild-type, como en los ratones KO para el receptor LPA1. Los resultados muestran un aumento progresivo de la distancia recorrida según aumenta la dosis, en los ratones wild-type, siendo la dosis de 20 mg/kg la que produce un efecto mayor. En el caso de los ratones KO para LPA1 se puede observar una hipolocomoción en relación el grupo wild-type, y un retardo en la respuesta a la cocaína, ya que a la dosis de 5 mg/kg no responden. Es a la dosis de 20 mg/kg a la que muestran una mayor actividad locomotora.

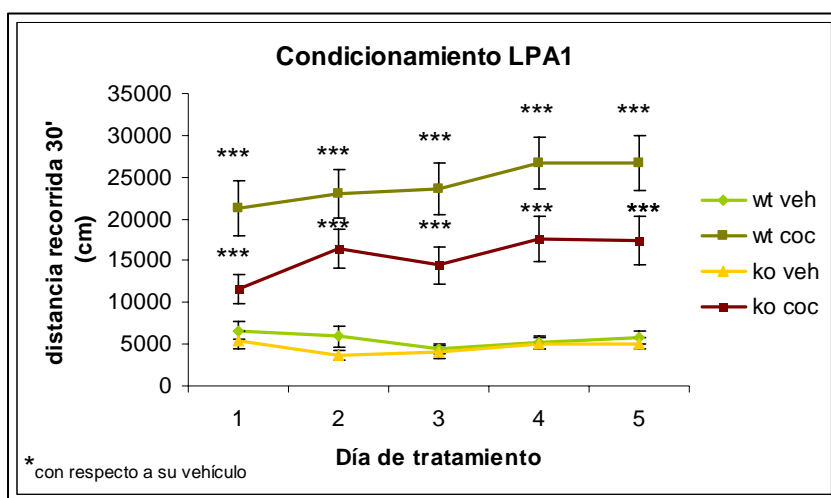


**Figura 69.** Curva dosis-respuesta a cocaína en ratones de la cepa C57 (WT) y en ratones KO para el gen del receptor LPA1. Se ensayan las dosis de 0, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína, y se mide la distancia recorrida en campo abierto durante 30 minutos. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=a1 menos 10).



## 1.2. Condicionamiento inducido por cocaína.

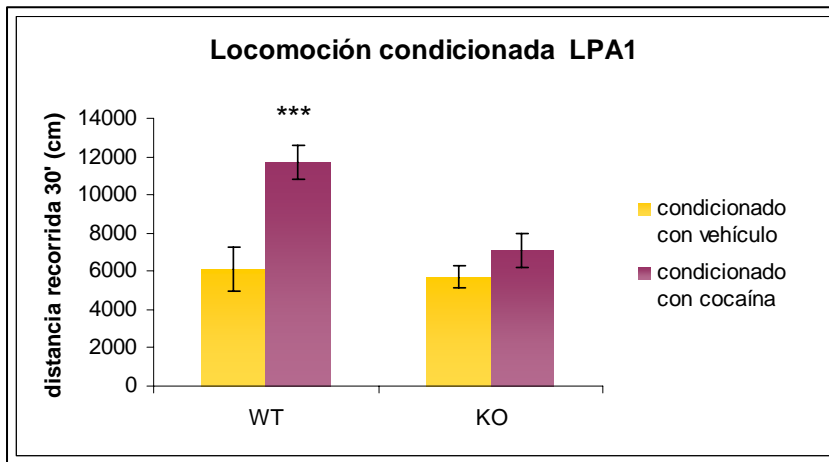
En el condicionamiento con cocaína (ver **figura 70**) seguido durante cinco días consecutivos, podemos ver que los dos genotipos tratados con cocaína muestran un aumento significativo de la actividad locomotora en comparación con sus vehículo. Sin embargo, los ratones KO para el receptor siempre mantienen su actividad por debajo de los ratones normales, aunque ambos grupos muestran sensibilización del efecto de la cocaína.



**Figura 70.** Efecto de la cocaína (20 mg/kg) sobre la distancia recorrida en ratones de la cepa C57 (WT) y en ratones KO para el receptor LPA1, durante cinco días consecutivos. Se compara, por genotipos, el efecto de la cocaína con respecto al vehículo en el mismo día. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

## 1.3. Locomoción condicionada inducida por cocaína.

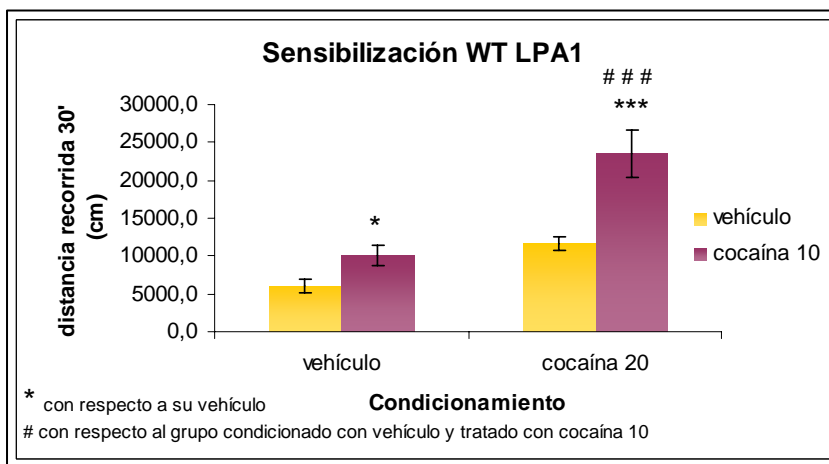
A los grupos anteriores, condicionados con vehículo o cocaína, se les somete al test del campo abierto, cinco días después de la última inyección de condicionamiento, en este caso administrando vehículo a todos los grupos. En este caso (ver **figura 71**), el grupo wild-type para el gen del receptor LPA1 muestra una respuesta locomotora condicionada en relación a su grupo vehículo. Sin embargo, el grupo KO para el receptor LPA1 que había sido condicionado con cocaína, no muestra un aumento significativo de la actividad locomotora en relación con el grupo KO que había sido condicionado con vehículo. El grupo KO para el receptor LPA1 no muestra locomoción condicionada.



**Figura 71.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones de la cepa C57 (WT) y los ratones KO para LPA1, cuando se ensaya de nuevo el campo abierto cinco días después de la última inyección, y tratando a los dos grupos con vehículo. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

#### 1.4.Sensibilización locomotora inducida por cocaína.

De nuevo, ensayamos con los mismos grupos de animales utilizados en el experimento de condicionamiento. Seis días después, se vuelve a someter a los ratones al campo abierto durante treinta minutos, pero en este caso a cada grupo de condicionamiento y para cada genotipo se le administrará vehículo o cocaína, y a una dosis de 10 mg/kg. De tal manera que tendremos cuatro grupos experimentales por cada genotipo.

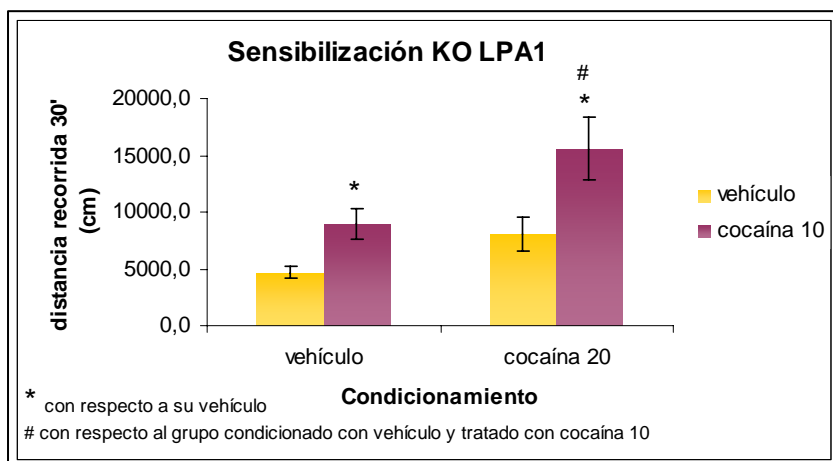


**Figura 72.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones de la cepa C57 (WT), cuando se ensaya de nuevo el campo abierto seis días después de la última inyección, y tratando, en este caso, a un grupo con vehículo y a otro con cocaína a una dosis de 10 mg/kg. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

En el caso de los ratones normales (ver **figura 72**), los resultados revelan un aumento de la actividad locomotora en los dos grupos que recibieron la dosis de 10 mg/kg de cocaína, con respecto a sus grupos vehículo. Además, este aumento es significativamente mayor en los ratones que habían sido condicionados inicialmente con cocaína, que en los ratones que



reciben por primera vez una dosis de cocaína. En el caso de los ratones KO para LPA1 (ver **figura 73**) ocurre el mismo efecto, aparece una sensibilización locomotora, aunque de manera menos robusta que en el wild-type.



**Figura 73.** Efecto del condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) durante 5 días, sobre la respuesta de los ratones KO para el receptor LPA1, cuando se ensaya de nuevo el campo abierto seis días después de la última inyección, y tratando, en este caso, a un grupo con vehículo y a otro con cocaína a una dosis de 10 mg/kg. Los resultados vienen expresados como Media  $\pm$  SEM (n=al menos 10).

## 2. RESULTADOS DE GENÓMICA

En este segundo conjunto de experimentos se muestran los efectos, a nivel de comportamiento y expresión génica, de la administración de cocaína, en ratones carentes del receptor LPA1, sobre los principales componentes del sistema cannabinoide y del sistema dopaminérgico. De manera que podemos estudiar las variaciones de expresión de ARNm debidas a la sensibilización a cocaína en ratones wild-type y en ratones knock out para este receptor, en comparación con los mismos genotipos tratados con vehículo.

En este caso el método de administración, consistió en inyectar durante cinco días consecutivos una dosis de 20 mg/kg de cocaína a un grupo wild-type y a un grupo ko, y al mismo tiempo se constituyeron otros dos grupos tratados con vehículo. Después de 7 días desde la última inyección, se volvió a administrar cocaína pero a una dosis de 10 mg/kg. Los grupos que habían sido tratados con vehículo, volvieron a recibir suero salino.



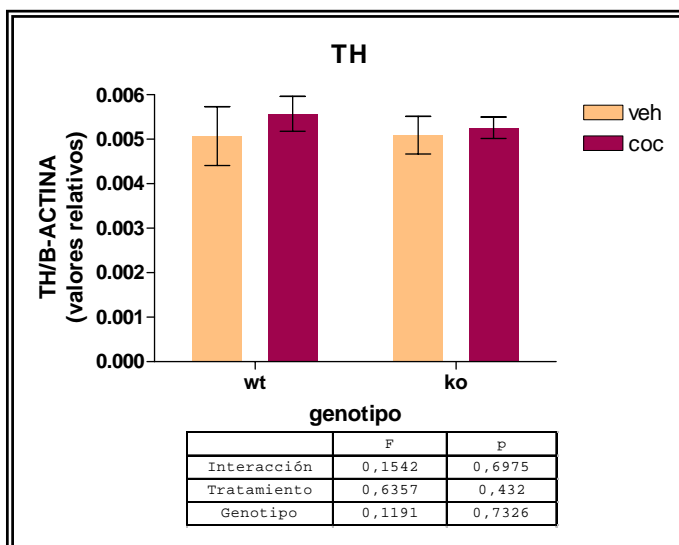
## 2.1. Sistema dopaminérgico

Como vimos anteriormente, el mecanismo de acción de los psicoestimulantes afecta directamente a los terminales dopaminérgicos mesolímbicos. Además, hay gran número de evidencias que indican que la dopamina contribuye, al menos en parte, en los efectos de refuerzo de muchas drogas de abuso.

Para ver si la ausencia de sensibilización en los ratones KO para el receptor de LPA tipo 1, está causada por cambios en el sistema dopaminérgico, mediremos la expresión génica de tres componentes de este sistema de neurotransmisión: la enzima de síntesis de la dopamina, el receptor de dopamina tipo 1 y el transportador de dopamina. Todo ello en estriado.

### 2.1.1 Síntesis

Los niveles de ARNm de la enzima de síntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa, en estriado (**ver figura 74**), no se ven afectados en nuestro experimento. Es decir, los niveles de expresión de esta enzima no varían en los animales KO para el receptor de LPA tipo 1, ni tampoco varían con la sensibilización a cocaína.

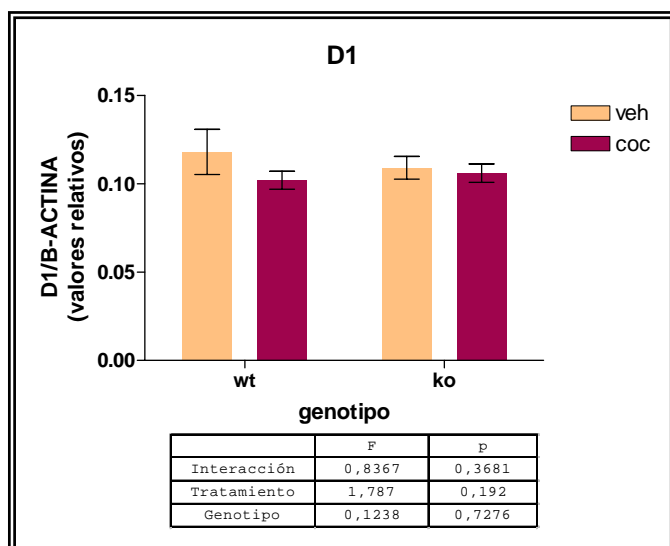


**Figura 74.** Niveles de ARNm de la enzima de síntesis, tirosina hidroxilasa, obtenidos de estriado de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.1.2 Receptor



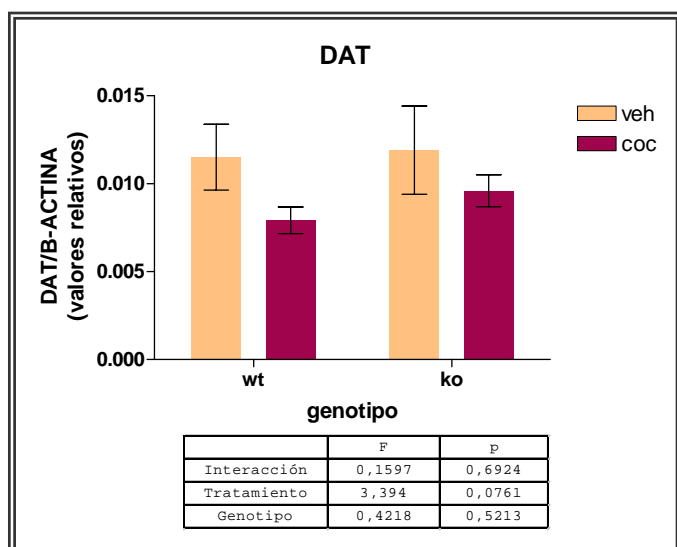
En el caso del receptor de dopamina D1, ocurre lo mismo que en el caso de la enzima de síntesis, no se aprecian cambios significativos a nivel de expresión génica en estriado (ver figura 75), ni debidos al genotipo ni al tratamiento con cocaína con respecto a los animales wild-type y a los animales tratados con vehículo.



**Figura 75.** Niveles de ARNm del receptor de dopamina tipo 1, obtenidos de estriado de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

### 2.1.3. Transportador

En el estudio del último componente del sistema dopaminérgico (ver figura 76) vemos que tampoco aparecen diferencias significativas en el nivel de ARNm, ni debidos al genotipo, ni debidos al tratamiento con cocaína. Es decir, el sistema dopaminérgico del estriado no se ve afectado en nuestro experimento.



**Figura 76.** Niveles de ARNm del transportador de dopamina, obtenidos de estriado de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



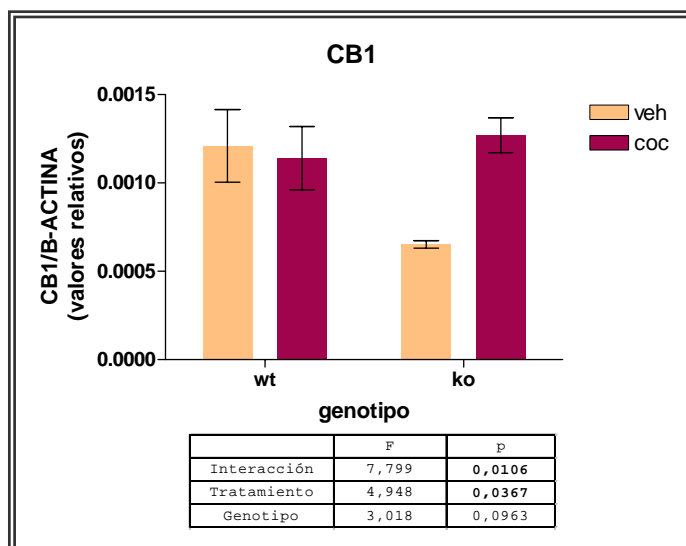
## 2.2 Sistema cannabinoide

En esta serie de experimentos medimos los niveles de ARNm de los distintos componentes del sistema cannabinoide para ver su implicación en la sensibilización a cocaína en nuestro modelo animal. Todos los genes se midieron en estriado, hipocampo, corteza prefrontal y cerebelo.

### 2.2.1. Estriado

#### 2.2.1.1 Receptor

El nivel de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 en estriado (**ver figura 77**) aumenta de manera significativa debido al tratamiento con cocaína. Sin embargo, el test estadístico ANOVA también da como significativo la interacción entre las variables, de manera que parte del efecto que vemos sobre el receptor CB1 se debe al genotipo. Los ratones carentes de LPA1 tienen menos receptor CB1 y la hiperactividad dopaminérgica asociada a la sensibilización lo incrementa notablemente.



**Figura 77.** Niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1, obtenidos de estriado de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.2.1.2 Síntesis

En el caso de la enzima de síntesis de cannabinoides NAPE-PLD en estriado (**ver figura 78**) se mantiene el patrón de expresión del receptor cannabinoide: hay un aumento de

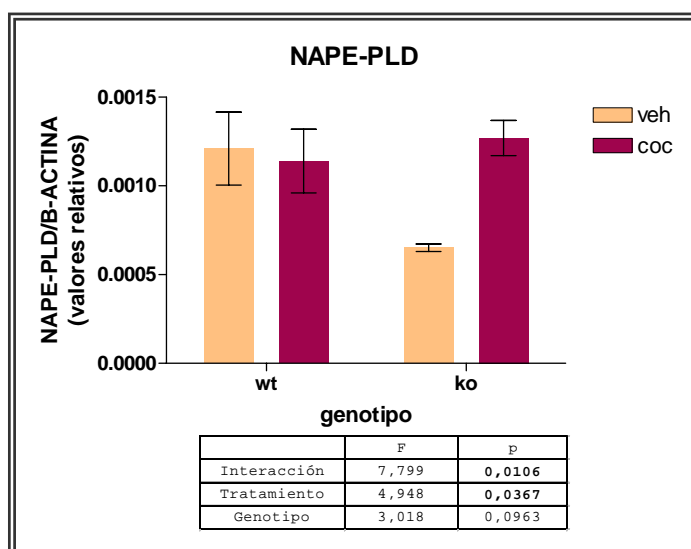


la enzima debido al tratamiento con cocaína pero debido, en parte, a un efecto simultaneo del genotipo, que por sí solo no llega a ser significativo. Esto indica que hay un incremento de actividad cannabinoide asociada a la actividad dopaminérgica inducida por cocaína.

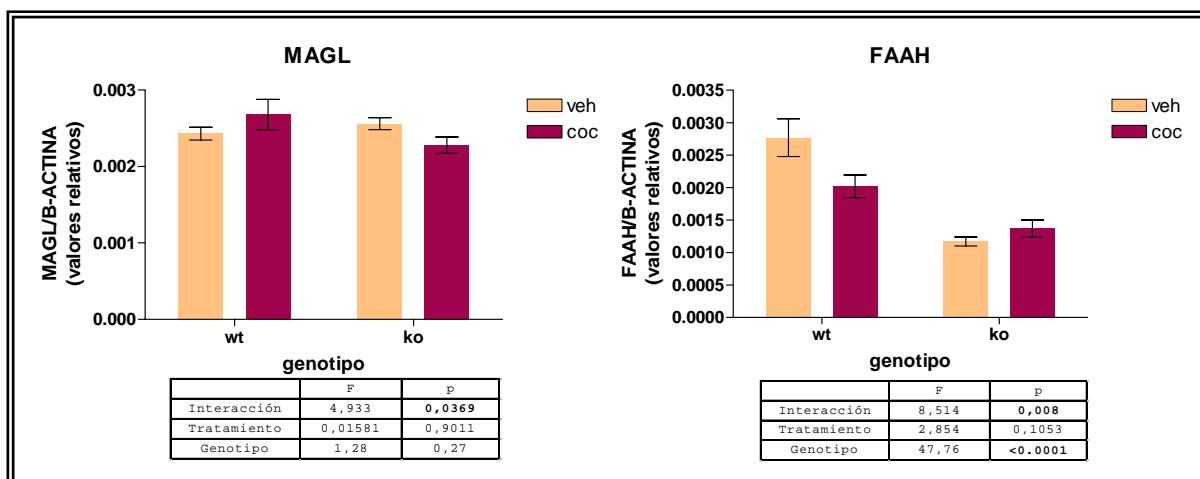
### 2.2.1.3 Degradación

En el caso de las enzimas de degradación cannabinoide en estriado (**ver figura 79**), hay un comportamiento diferente de la expresión génica dependiendo de la enzima estudiada. En el caso del nivel de ARNm de MAGL no hay cambios debidos ni al tratamiento con cocaína ni al genotipo, aunque aparece una interacción significativa que indica que un factor depende del otro, aunque en este caso no aparecen efectos reveladores.

En el caso de FAAH, hay un efecto del genotipo muy claro, los niveles de ARNm de esta enzima de degradación disminuyen drásticamente en los ratones ko para el receptor LPA tipo 1. Sin embargo, sigue apareciendo una interacción entre los factores principales.



**Figura 78.** Niveles de ARNm de la enzima de síntesis NAPE-PLD, obtenidos de estriado de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

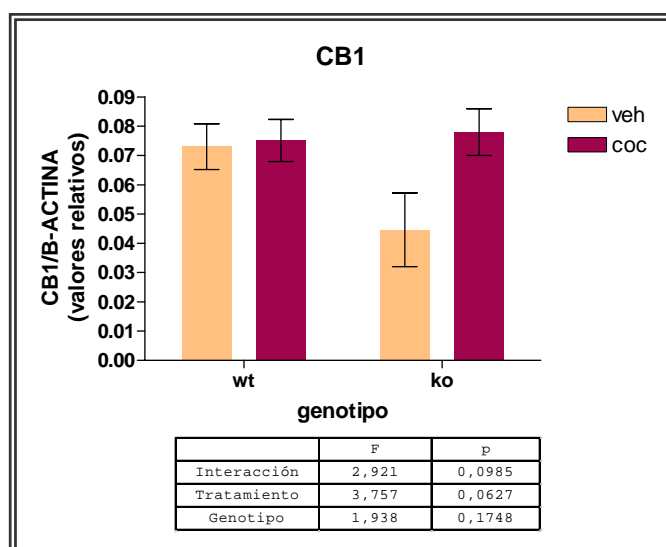


**Figura 79.** Niveles de ARNm de las enzimas de degradación cannabinoide, obtenidos de estriado de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

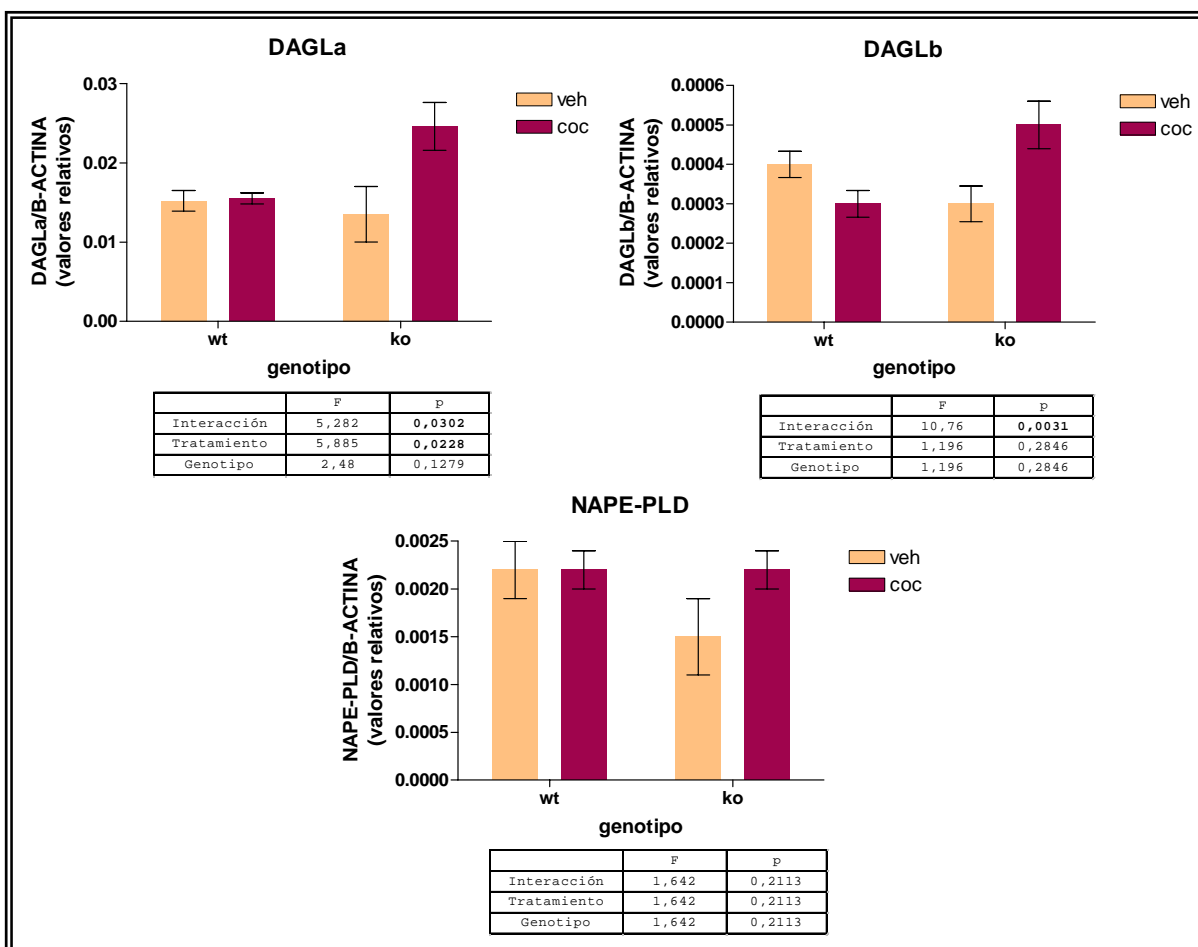
## 2.2.2 Hipocampo

### 2.2.2.1 Receptor

Los niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 en hipocampo (**ver figura 80**) no se ven afectados por ninguno de los dos factores estudiados en este experimento, de manera que son independientes tanto del tratamiento con cocaína como del genotipo.



**Figura 80.** Niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 en hipocampo, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 81.** Niveles de ARNm de las enzimas de síntesis cannabinoide en hipocampo, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

#### 2.2.2.2 Síntesis

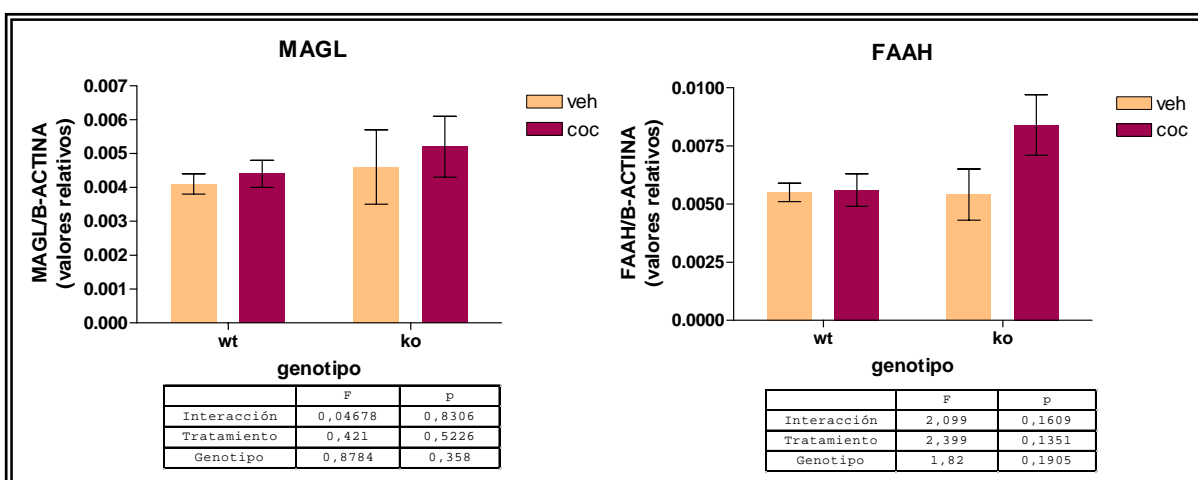
Para estudiar el efecto de la cocaína sobre la síntesis de cannabinoides en hipocampo, medimos la expresión génica de las dos isoformas de la enzima DAGL, como en el caso de los ratones C57, y además, la enzima NAPE-PLD (**ver figura 81**). Los niveles de ARNm de la NAPE-PLD no se ven afectados en el hipocampo por ninguno de los dos factores estudiados. Sin embargo, sí hay variaciones en la DAGL, aunque diferentes dependiendo de la isoforma que midamos. Así, para la isoforma beta no hay cambios relevantes aunque aparece una interacción significativa. En el caso de la isoforma alfa, hay un efecto



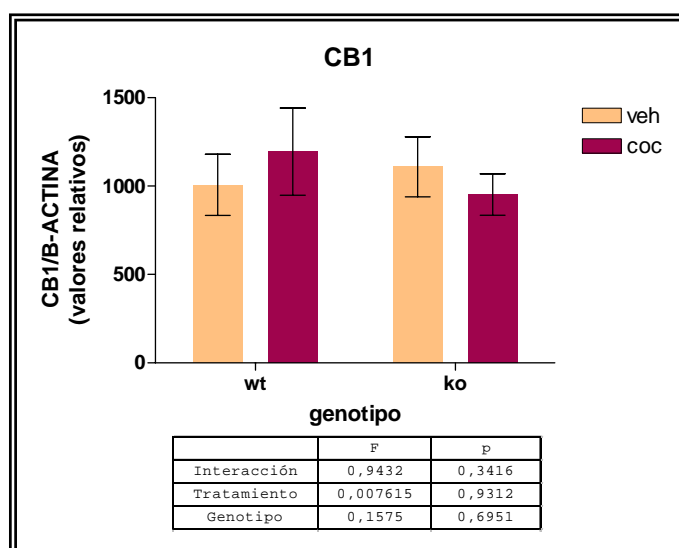
significativo del tratamiento con cocaína, de manera que la administración de la droga aumenta los niveles de ARNm de esta isoforma, pero dependiente del genotipo, ya que la interacción también es significativa.

### 2.2.2.3 Degradación

Los niveles de ARNm de las enzimas de degradación cannabinoide en hipocampo (ver figura 82) no varían con el tratamiento a cocaína ni varían por el genotipo.



**Figura 82.** Niveles de ARNm de las enzimas de degradación cannabinoide en hipocampo, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 83.** Niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 en corteza prefrontal, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



## 2.2.3 Corteza prefrontal

### 2.2.3.1 Receptor

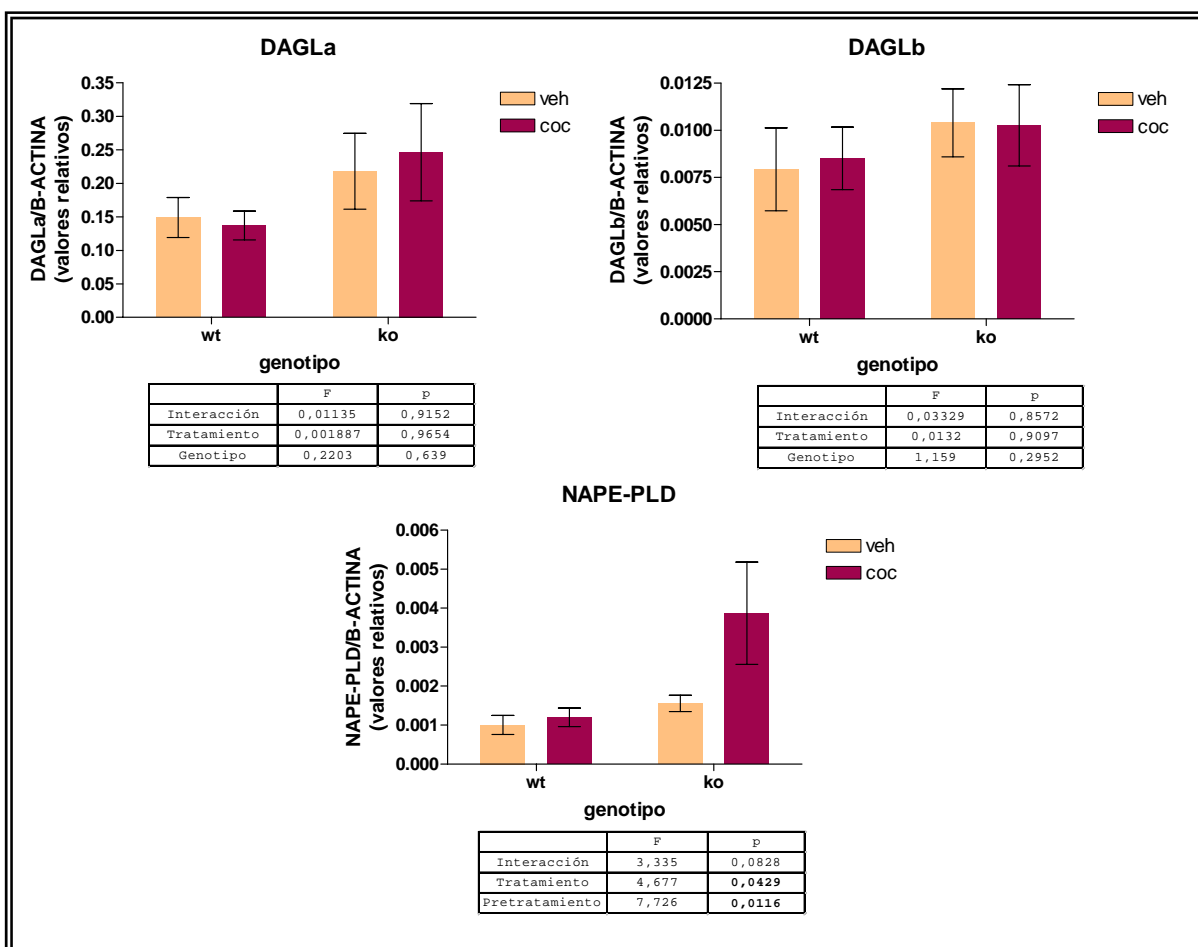
Los niveles de ARNm del receptor CB1 en corteza prefrontal (**ver figura 83**) medidos por PCR a tiempo real no varían en los ratones ko para el gen del receptor LPA tipo 1, ni tampoco varían con el tratamiento con cocaína.

### 2.2.3.2 Síntesis

En el caso de la corteza prefrontal, las enzimas de síntesis siguen otro patrón de expresión diferente al que seguían en estriado (**ver figura 84**). En esta área cerebral, ninguna de las dos isoformas de la enzima DAGL sufre cambios. Sin embargo, NAPE-PLD se ve afectada tanto por el genotipo como por el tratamiento, de manera que los ko para el gen del receptor de LPA tipo 1 tienen aumentados los niveles de la enzima de síntesis. Además, el tratamiento con cocaína aumenta a su vez la expresión de la NAPE-PLD.

### 2.2.3.3 Degradación

El nivel de expresión de las enzimas de degradación de los cannabinoides en hipocampo (**ver figura 85**) es diferente dependiendo de la enzima estudiada. Así, los niveles de FAAH no varían ni con el genotipo ni con el tratamiento con droga. Sin embargo, los niveles de ARNm de la enzima MAGL varían con el genotipo, de manera que los niveles de MAGL es KO son más altos. No obstante, aparece también como significativa una interacción entre los factores, por lo que el efecto que vemos debido al genotipo es también debido en parte al tratamiento con cocaína.

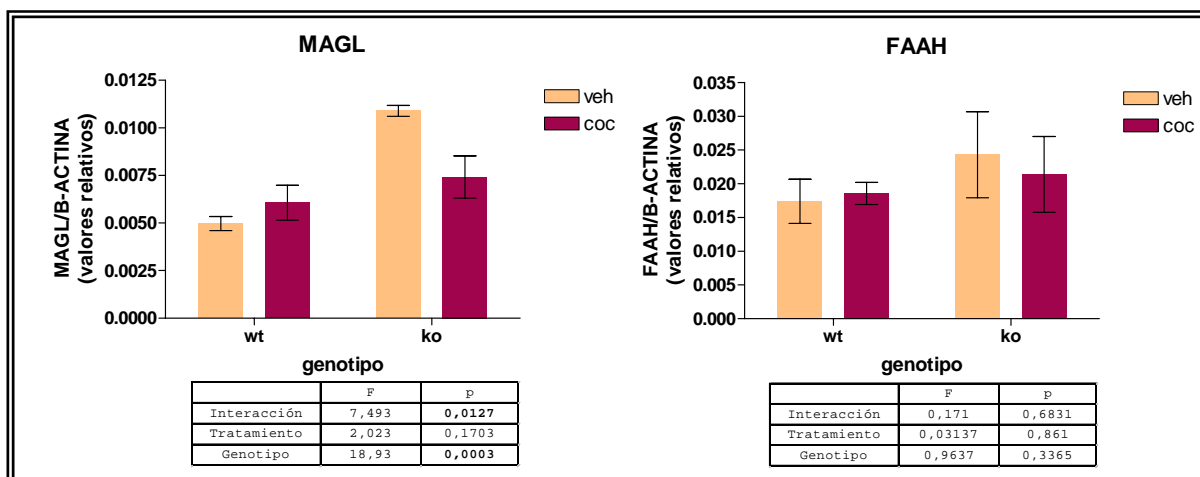


**Figura 84.** Niveles de ARNm de las enzimas de síntesis cannabinoide en corteza prefrontal, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

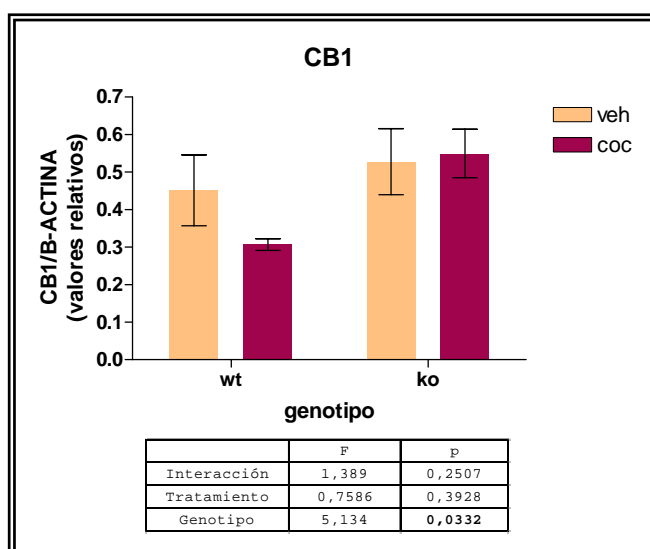
## 2.2.4 Cerebelo

### 2.2.4.1 Receptor

Los niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 en cerebelo (ver figura 86) son diferentes entre los grupos debido al genotipo. Los ratones KO para el gen del receptor de LPA tipo 1 tienen los niveles de ARNm de CB1 más altos que los ratones wild-type.



**Figura 85.** Niveles de ARNm de las enzimas de degradación cannabinoide en cerebelo, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**Figura 86.** Niveles de ARNm del receptor cannabinoide tipo 1 en cerebelo, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

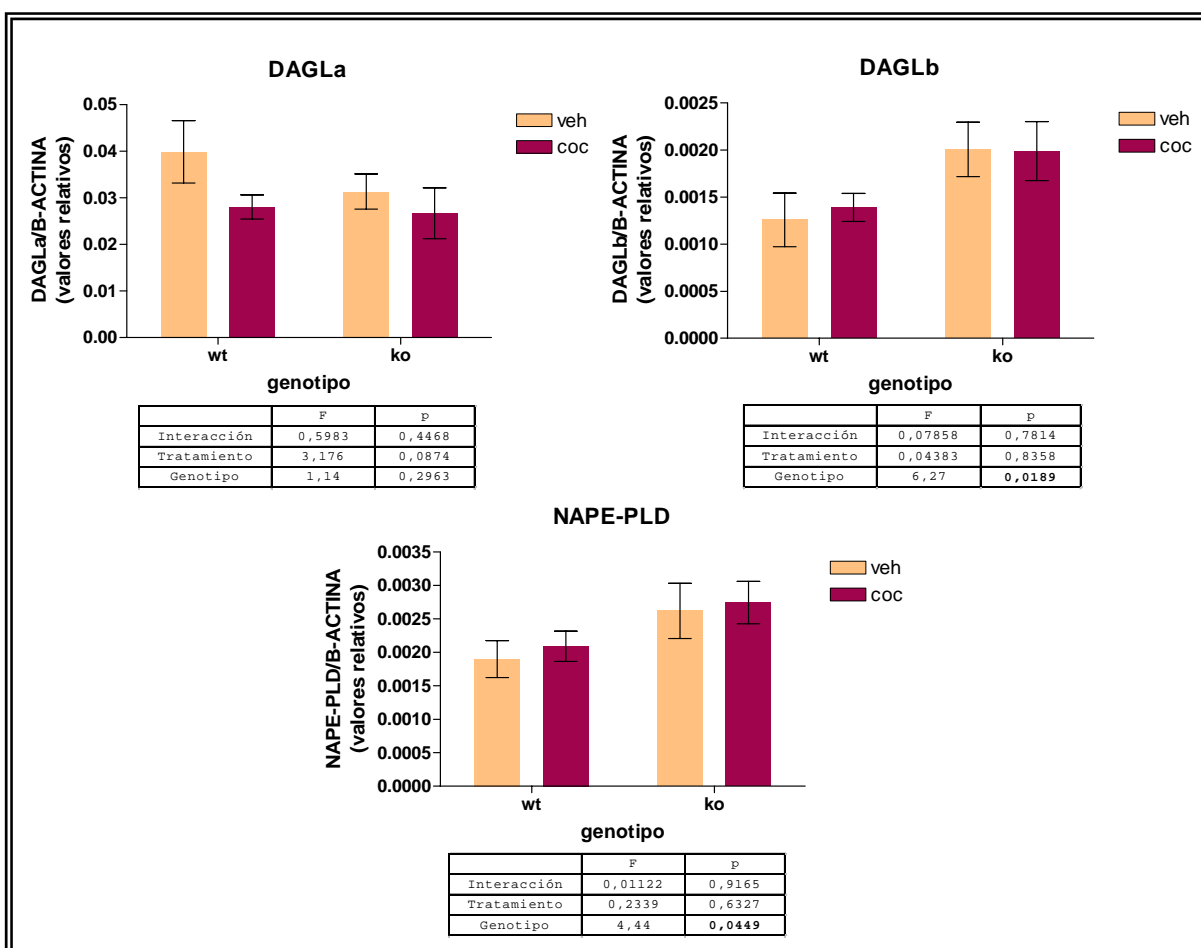
#### 2.2.4.2 Síntesis

El patrón de expresión de la síntesis cannabinoide en cerebelo (ver **figura 87**) varía dependiendo de la enzima estudiada. En el caso de NAPE-PLD se observa un efecto muy claro del genotipo sobre la expresión, de manera que los ratones KO tienen unos niveles de ARNm de esta enzima superiores a los de los ratones wild-type.

Con respecto a DAGL, en el caso de la isoforma alfa, no vemos ningún cambio significativo, mientras que en el caso de la isoforma beta hay un efecto del genotipo, al igual

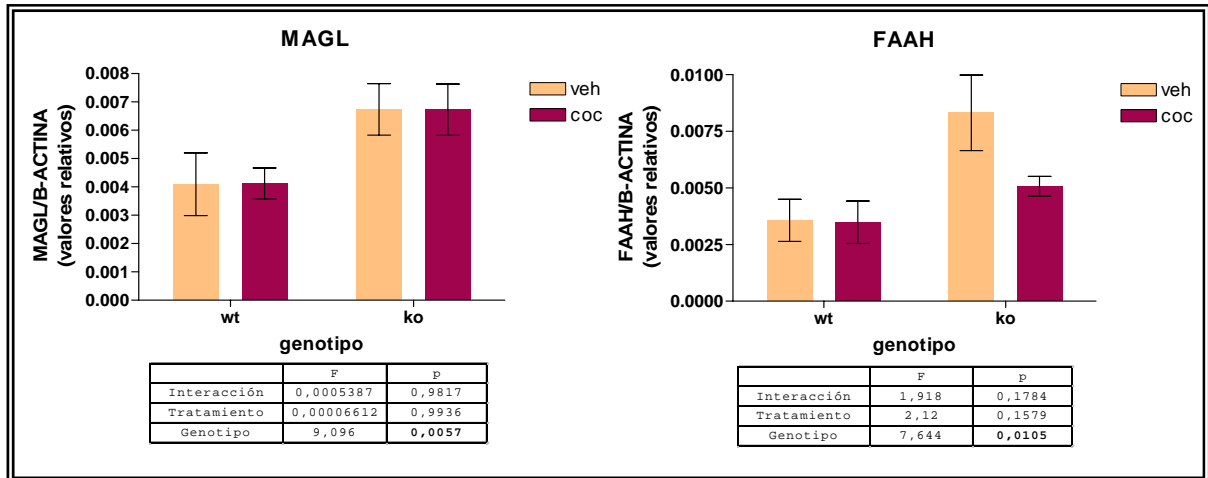


que para NAPE-PLD. Los niveles de ARNm de DAGL $\beta$  están aumentados en los animales KO.



**Figura 87.** Niveles de ARNm de las enzimas de síntesis cannabinoide en cerebelo, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media $\pm$ SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.

El patrón de expresión de las enzimas de síntesis en cerebelo (**ver figura 88**) es similar para las dos enzimas estudiadas. En ambos casos aparece un efecto significativo del genotipo. También en este caso, como en el resto de componentes del sistema cannabinoide en cerebelo, hay una elevación del ARNm de las enzimas en los ratones KO para el gen del receptor LPA1.



**Figura 88.** Niveles de ARNm de las enzimas de degradación cannabinoide, obtenidos de ratones tratados durante 5 días consecutivos con vehículo o cocaína (20 mg/kg), seguido de una exposición aguda de vehículo o cocaína (10 mg/kg) 7 días después. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Media±SEM; n=8). La tabla muestra los resultados del análisis ANOVA de dos vías considerando el pretratamiento crónico y el tratamiento agudo como factores principales.



**IMABIS**

**DISCUSIÓN**

---



Los resultados comportamentales vistos en los animales de la cepa C57 nos muestran los fenómenos típicos producto de la exposición crónica a cocaína. Por un lado aparece la sensibilización locomotora y por otro la locomoción condicionada.

La expresión de los distintos componentes del sistema dopaminérgico en hipocampo y en estriado son especulares. Hay que tener en cuenta que en el hipocampo hay una fuerte presencia de terminales noradrenérgicos que podrían contribuir a las acciones descritas.

El hecho de que estos animales sensibilizados muestren un incremento de la enzima de síntesis de la dopamina, TH, unido al fuerte incremento del transportador, indican que en el hipocampo la sensibilización/locomoción condicionada tiene un sustrato dopaminérgico importante que podría estar relacionado con la memoria contextual que se activa en los procesos de condicionamiento espacial asociados a la administración de cocaína.

Por otro lado, la corteza prefrontal es un sustrato importante en la sensibilización a cocaína posiblemente al determinar estrategias comportamentales fijas (estereotipias, locomoción condicionada, condicionamiento, etc.).

Los endocannabinoides participan en la plasticidad sináptica del sistema mesolímbico, relacionada con los procesos de aprendizaje asociados a la adicción. De ahí el estudio de sus componentes en nuestros modelos animales, además de por el hecho de ser potentes moduladores de transmisión glutamatérgica. Así, se ha descrito que los receptores CB1 localizados presinápticamente regulan la liberación de glutamato y GABA en el ATV, modificando la actividad eléctrica de estas neuronas dopaminérgicas.

En general, en la corteza prefrontal se observa una hiperfunción cannabinoide, reflejó quizá de una hipoactividad de las neuronas de esta zona que proyectan al VTA, lo que la liberaría de la inhibición GABAérgica a la que está sometida.

En estriado aparece una disminución de la síntesis de endocannabinoides con la exposición repetida a cocaína por una regulación a la baja de la isoforma de síntesis



DAGL $\beta$ , que es la que se regula en estos procesos. A su vez este proceso sería regulado en esta zona por una regulación a la baja de las enzimas de degradación. En el hipocampo ocurre un efecto parecido, pero en este caso es DAGL $\alpha$  la enzima que se regula a largo plazo.

Todos estos cambios acaban actuando directa o indirectamente en el sistema glutamatérgico, que juega un papel relevante en las acciones de la cocaína en particular y las drogas en general. Los cambios que se producen en este sistema de neurotransmisión son diferentes según sea la exposición a la droga. Con la administración aguda disminuye la expresión de genes glutamatérgicos, tanto enzimas de síntesis, como subunidades de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, o del transportador de glutamato. Sin embargo, la sensibilización revierte este efecto y se dispara la expresión génica de este sistema, en todas las áreas relacionadas con el sistema de recompensa.

Como hemos visto, los endocannabinoides son importantes neuromoduladores de la transmisión glutamatérgica, sin embargo no lo es la OEA, ya que actúa a través de un receptor distinto a CB1. En los animales carentes del receptor PPAR $\alpha$ , todos los procesos comportamentales asociados a la exposición a cocaína son similares a los que ocurren en los animales salvajes. Por esto, se puede asumir que ni la OEA ni su receptor intervienen en los fenómenos de adicción.

Otro de los sistemas moduladores del sistema glutamatérgico es el del ácido lisofosfatídico y el receptor LPA1, implicado en la plasticidad sináptica. Según nuestros estudios, el receptor LPA1 estaría implicado en la formación de la memoria específica de contexto, con base en el hipocampo, ya que los ratones carentes de este receptor no muestran locomoción condicionada tras una exposición crónica a cocaína. Sin embargo, el



receptor LPA1 no estaría implicado en la memoria procedimental ya que los ratones carentes del receptor tipo 1 del ácido lisofosfatídico muestran sensibilización a cocaína. Es más, en estos animales hay un incremento de la actividad del sistema endocannabinoide asociado a la actividad dopaminérgica inducida por cocaína.



## CONCLUSIONES

---



1. La exposición crónica a cocaína produce cambios adaptativos en distintas áreas cerebrales estar basados en cambios en la expresión de genes relacionados con los procesos de aprendizaje y memoria subyacentes a la adicción a cocaína.
2. El receptor de ácido lisofosfatídico tipo 1 está implicado en la locomoción condicionada por contexto que tiene naturaleza episódica y una base hipocampal.
3. El receptor PPAR $\alpha$  no está implicado en los fenómenos relacionados con la exposición crónica a cocaína, ya que no hay variación de estos procesos en los animales carentes del receptor.
4. La OEA no está implicada en los fenómenos relacionados con la exposición crónica a cocaína, ni a través de PPAR $\alpha$ , ni a través de otro receptor diferente.
5. El sistema de neurotransmisión glutamatérgica varía la expresión génica de sus componentes de manera diferencial según sea la exposición a cocaína. De manera que con la exposición aguda a la droga hay una disminución de la expresión génica, mientras que con la exposición crónica se produce un efecto de rebote.
6. El sistema cannabinoide actúa como regulador del efecto de la cocaína sobre el sistema glutamatérgico, variando la expresión del receptor CB1, la síntesis y degradación de los endocannabinoides en las distintas regiones cerebrales para contrarrestar los efectos de la cocaína.





## BIBLIOGRAFÍA

---



Akimoto K, Hamamura T, Otsuki S. Subchronic cocaine treatment enhances cocaine-induced dopamine efflux, studied by in vivo intracerebral dialysis. *Brain Res.* 1989. 26, 339-44.

Aledo J.C., Gómez-Fabre P.M., Olalla L. and Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes, *Mamm. Genome* 2000.<sub>11</sub>, 1107–1110.

Allard J, Barron S, Diaz J, Lubetzki C, Zalc B, Schwartz J, Sokoloff PA. A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *Eur. J. Neurosci.* 1998. 10, 1045-1053

Altman J. A biological view of drug abuse. *Mol Med Today.* 1996. 6, 237-41.

Ambre JJ, Ruo TI, Smith GL, Backes D, Smith CM. Ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine. *J Anal Toxicol.* 1982. 1, 26-9.

An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 231, 619-622.

Anderson SM, Pierce RC. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol Ther.* 2005. 106, 389-403.

Arnold JC. The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005. 81, 396-406.

Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron.* 2000 25, 515-32.

Beurrier C, Malenka RC. Enhanced inhibition of synaptic transmission by dopamine in the nucleus accumbens during behavioral sensitization to cocaine. *J Neurosci.* 2002. 22, 5817-22.

Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 256, 377-80.

Bordet R., Ridray S., Carboni S., Diaz J., Sokoloff P. and Schwartz J.C. Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. 94, 3363–3367.

Boudreau, A.C., and Wolf, M.E. (2005). Behavioural sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus acumbens. *J. Neurosci.* 25, 9144-9151.

Brenhouse HC, Montalto S, Stellar JR. Electrolytic lesions of a discrete area within the nucleus accumbens shell attenuate the long-term expression, but not early phase, of sensitization to cocaine. *Behav Brain Res.* 2006. 170, 219-23.

Brindley DN, Waggoner DW. Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem* 1998. 273, 24281- 24284.

Bubin AE, Bahnson T, Weiner JA, Fukushima N, Chun J. Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *J Neurosci* 1999. 19, 1371-1381.

Calignano A, La Rana G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* 2001. 419, 191-8.



Capasso R, Izzo AA, Fezza F, Pinto A, Capasso F, Mascolo N, Di Marzo V. Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol.* 2001. 134, 945-50.

Carr KD, Yamamoto N, Omura M, Cabeza de Vaca S, Krahne L. Effects of the D(3) dopamine receptor antagonist, U99194A, on brain stimulation and d-amphetamine reward, motor activity, and c-fos expression in ad libitum fed and food-restricted rats. *Psychopharmacology* 2002. 163, 76-84.

Chenard BL, Menniti FS. 1999. Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Res* 5, 381-404.

Chevalyere V, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron.* 2004. 43, 871-81.

Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Huganir RL. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci.* 2004. 45, 10248-59.

Cipitelli A, Bilbao A, Gorriti MA, Navarro M, Massi M, Piomelli D, Ciccocioppo R, Rodriguez de Fonseca, F. The anandamide transport inhibitor AM404 reduces ethanol self-administration.. *Eur J Neurosci.* 2007. 26: 476-86.

Collingridge G.L. and Lester R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system, *Pharmacol. Rev.* 1989. 40, 143–210.

Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the Lpa1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97, 13384-13389.

Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptor. *Mol Pharmacol* 2000. 58, 1188-1196.

Contos JJ. Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the LPA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97, 13384-13389.

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

Curthoys N.P. and Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism, *Annu. Rev. Nutr* 1995. 15, 133–159.

Dalia AD, Norman MK, Tabet MR, Schlueter KT, Tsibulsky VL, Norman AB. Transient amelioration of the sensitization of cocaine-induced behaviors in rats by the induction of tolerance. *Brain Res.* 1998. 797, 29-34.

De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med.* 2001. 7, 1151-4.

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

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999. 5, 649-88.



Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Jarbe TU, Eisen MS, Mechoulam R. A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1992. 35, 2065-9.

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988. 34, 605-13.

Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol.* 1998. 12, 54-67.

Ding L., Liang X., Zhu D., Lou Y. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is involved in cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells in vitro. *Cell Biology International* 2007. 31, 1002-1009.

Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 1993. 291, 677-680.

Elphick MR, Egertova M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001.

Erecinska M. and Silver I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain, *Prog. Neurobiol.* 1990. 35, 245-296.

Ferrer B, Gorriti MA, Palomino A, Gornemann I, de Diego Y, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Fernandez-Espejo E, Moratalla R, Navarro M, Rodríguez de Fonseca F. Cannabinoid CB1 receptor antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies. *Eur J Pharmacol.* 2007. 559: 180-3.

Fleming JA, Byck R, Barash PG. Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. *Anesthesiology.* 1990. 73, 518-31.

Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain, *J. Neurochem.* 1984. 42, 1-11.

Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Laballe F. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995. 80, 919-927.

Freeman WM, Brebner K, Lynch WJ, Robertson DJ, Roberts DC, Vrana KE. Cocaine-responsive gene expression changes in rat hippocampus. *Neuroscience.* 2001. 108, 371-80.

Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 2003. 83, 1017-66.

Fride E, Mechoulam R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol.* 1993. 231, 313-4.

Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system--an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002. 66, 221-33.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature.* 2003. 425, 90-3.

Fukushima N, Weiner JA, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol* 2000. 228, 6-18.



Gardner EL. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005. 81, 263-84.

Gerdeman GL, Partridge JG, Lupica CR, Lovinger DM. It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2003. 26, 184-92.

Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci.* 2002. 5, 446-51.

Ghasemzadeh MB, Nelson LC, Lu XY, Kalivas PW. Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptor mRNA produced by cocaine treatment. *J Neurochem.* 1999. 72, 157-65.

Giuffrida A, Rodríguez de Fonseca F, Piomelli D. Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2000. 280, 87-93.

Goldstein A. *Addiction: from biology to drug policy* (2nd ed.), Oxford University Press, New York (2001).

Gómez-Fabre P.M., Aledo J.C., del Castillo-Olivares A., Alonso F.J., Núñez de Castro I., Campos J.A. and Márquez J. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase, *Biochem. J.* 2000. 345, 365–375.

Gorriti MA, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Palomo T. Chronic (-)-delta9-tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999. 365: 133-42.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98, 3662-5.

Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 1996. 135, 1071-1083.

Heimer L, Alheid GF, de Olmos JS, Groenewegen HJ, Haber SN, Harlan RE, Zahm DS. The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1997. 9, 354-81.

Henry DJ, White FJ. Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991. 258, 882-90.

Hoffman RS, Henry GC, Wax PM, Weisman RS, Howland MA, Goldfrank LR. Decreased plasma cholinesterase activity enhances cocaine toxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992. 263, 698-702.

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994. 17, 31-108.  
Holmstedt BR. Analysis of drugs and psychoactive phenolic amines. *Psychopharmacol Bull.* 1979. 15, 51-2.

Insel TR. Is social attachment an addictive disorder? *Physiol Behav.* 2003. 79, 351-7.

Izumi Y, Zorumski CF. LTP in CA1 of the adult rat hippocampus and voltage-activated calcium channels. *Neuroreport.* 1998. 9, 3689-91.



Jalink K, van Corven EJ, Hengeveid T, Morii N, Narumiya S. Inhibition of Isophosphatidate and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* 1994. 126, 801-810.

Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2005. 77, 128-38.

Jekel JF, Allen DF, Podlewski H, Clarke N, Dean-Patterson S, Cartwright P. Epidemic free-base cocaine abuse. Case study from the Bahamas. *Lancet*. 1986. 1, 459-62.

Julian MD, Martin AB, Cuellar B, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Moratalla R, García-Segura LM. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience*. 2003. 119: 309-18.

Kalivas P.W. Glutamate systems in cocaine addiction, *Curr Opin Pharmacol* 2004. 4, 23–29.

Kalivas PW, Duffy P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J Neurosci*. 1993. 13, 266-75.

Kalivas PW. Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict*. 2007. 16: 71-8.

Karch SB, Stephens BG, Tseng A.. Does ethanol enhance cocaine toxicity? *J Clin Forensic Med*. 1999. 6, 19-23.

Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*. 2001. 21, 9506-18.

Keinonen K, Kohr G, Seeburg PH, Laukkanen ML, Oker-Blom C. High-level expression of functional glutamate receptor channels in insect cells. *Biotechnology (N Y)*. 1994. 12, 802-6.

Kelly D. P., Lehman J. J., Barger P. M., Huss, J. M., Weinheimer C. J., Kovacs A., Courtois M. R. and Leone T. C. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism: Lessons from genetically altered mice *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2001. 33, 158.

Kelz MB, Chen J, Carlezon WA Jr, Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature*. 1999. 401, 272-6.

Khan Z.U., Mrzljak L., Gutierrez A., de la Calle A. and Goldman-Rakic P.S. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998. 95, 7731–7736.

Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91, 7355-9.

Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, O'Dell LE, Parsons LH, Sanna PP. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004. 27, 739-49.



Kovacevic Z. and McGivan J.D. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance, *Physiol. Rev.* 1983. 63, 547–605.

Krebs H.A. The synthesis of glutamine from glutamate and ammonia, and the enzymatic hydrolysis of glutamine in animal tissues, *Biochem. J.* 1935. 29, 1951–1969.

Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci.* 1991. 14, 299-302.

Küppenbender KD, Standaert DG, Feuerstein TJ, Penney JB Jr, Young AB, Landwehrmeyer GB. Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol.* 2000. 419, 407-21.

Kuribara H. Effects of interdose interval on ambulatory sensitization to methamphetamine, cocaine and morphine in mice. *Eur J Pharmacol.* 1996. 316, 1-5.

Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem.* 1999. 6, 757-73.

Laurier LG, Corrigan WA, George SR. Dopamine receptor density, sensitivity and mRNA levels are altered following self-administration of cocaine in the rat. *Brain Res.* 1994. 634, 31-40.

Li Y, White FJ, Wolf ME. Pharmacological reversal of behavioral and cellular indices of cocaine sensitization in the rat. *Psychopharmacology.* 2000. 151, 175-83.

Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol.* 2001. 59, 960-4.

Lichtman AH, Martin BR. Cannabinoid tolerance and dependence. *Handb Exp Pharmacol.* 2005. 168, 691-717.

Liu Xian-Yu, Xiang-Ping Chu, Li-Min Mao, Min Wang, Hong-Xiang Lan, Ming-Hua Li, Guo-Chi Zhang, Nikhil K. Parelkar, Eugene E. Fibuch, Michelle Haines, Kim A. Neve, Fang Liu, Zhi-Gang Xiong and John Q. Wang. Modulation of D2R-NR2B Interactions in Response to Cocaine. *Neuron* 2006. 52, 897-909.

Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci.* 2005 62, 708-16.

Lu YM, Jia Z, Janus C, Henderson JT, Gerlai R, Wojtowicz JM, Roder JC. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci.* 1997. 17, 5196-205.

Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 2006. 29, 225-32.

Martin AB, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti MA, Bilbao A, Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Moratalla R. Expresión and function of CB(1) receptor in the rat striatum: localization and effects on D(1) and D(2) dopamina receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology.* 2007.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990. 346, 561-4.



McDonald RJ, White NM. Information acquired by the hippocampus interferes with acquisition of the amygdala-based conditioned-cue preference in the rat. *Hippocampus*. 1995. 5, 189-97.

McGiffert C, Contos JJ, Friedman B, Chun J. Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p in neurogénesis an s1p in angiogénesis. *FEBS Lett* 2002. 531, 103-108.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995. 50, 83-90.

Mechoulam R, Gaoni Y. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron*. 1965. 21, 1223-9.

Medvedev IO, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Bohn LM, Caron MG, Dykstra LA. Characterization of conditioned place preference to cocaine in congenic dopamine transporter knockout female mice. *Psychopharmacology*. 2005. 180, 408-13.

Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 1998. 20, 445-68.

Moolenaar WH, Meeteren LA, Giepmans BNG. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 2004. 26, 870-881.

Moolenaar WH. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 1999. 253, 230-238.

Murillo-Rodriguez E, Cabeza R, Mendez-Diaz M, Navarro L, Prospero-Garcia O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport*. 2001. 12, 2131-6.

Nash JE, Hill MP, Brotchie JM. Antiparkinsonian actions of blockade of NR2B-containing NMDA receptor in the reserpine-treated rat. *Exp Neurol* 1999. 155:42-48.

Nestler EJ, Terwilliger RZ, Walker JR, Sevarino KA, Duman RS. Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. *J Neurochem*. 1990. 55, 1079-82.

Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*. 2005. 8, 1445-9.

Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict. Neurosci*. 2004. 5, 483-494.

Nestler EJ. Historical review: molecular and cellular mechanism of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci*. 2004. 25: 210-8.

Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 2003. 278, 25600-25606.

Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, Min KT, Kennedy MB. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulindependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*. 1996. 271, 31670-8.



Park KS, Lee RD, Kang SK, Han SY, Park KL, Yang KH, Song YS, Park HJ, Lee YM, Yun YP, Oh KW, Kim DJ, Yun YW, Hwang SJ, Lee SE, Hong JT. Neuronal differentiation of embryonic midbrain cells by upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the JNK-dependent pathway. *Exp Cell Res*. 2004. 297, 424-33.

Paulson PE, Robinson TE. Sensitization to systemic amphetamine produces an enhanced locomotor response to a subsequent intra-accumbens amphetamine challenge in rats. *Psychopharmacology*. 1991. 104, 140-1.

Pfaus JG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC. Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Res*. 1995. 693, 21-30.

Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997. 25, 192-216.

Pierce RC, Kumaresan V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev*. 2006. 30, 215-38.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*. 1995. 34, 1-26.

Pizzi M, Boroni F, Moraitis K, Bianchettia A, Memo M, Spano P. Reversal of glutamate excitotoxicity by activation of PKC-associated metabotropic glutamate receptor in cerebellar granule cells relies on NR2C subunit expression. *Eur J Neurosci* 1999. 11, 2489-2496.

Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Bot AG, Alblas J. Serum-induced membrane depolarisation in quiescent fibroblast: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled Lpa receptor. *EMBO J* 1996. 15, 63-72.

Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Offermanns S, Moolenaar WH. Galfa mediates activation of a depolarising chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells. *Curr Biol* 2001. 11, 121-124.

Pulvirenti L, Maldonado-Lopez R, Koob GF. NMDA receptors in the nucleus accumbens modulate intravenous cocaine but not heroin self-administration in the rat. *Brain Res*. 1992. 594, 327-30.

Ramakers GJ, Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res* 1998. 245, 252-262.

Riegel AC, Lupica CR. Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J Neurosci*. 2004. 24, 11070-8.

Robbe D, Bockaert J, Manzoni OJ. Metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent long-term depression in the nucleus accumbens is blocked in morphine withdrawn mice. *Eur J Neurosci*. 2002. 16, 2231-5.

Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol*. 1996. 6, 228-36.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*. 2001. 414, 209-12.



Rodriguez de Fonseca F, del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro N. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*. 2005. 40: 2-14.

Rodriguez-Puertas R, Herrera-Marschitz M, Koistinaho J, Hokfelt T. Dopamine D1 receptor modulation of glutamate receptor messenger RNA levels in the neocortex and neostriatum of unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience*. 1999. 89, 781-97.

Rostas JA, Brent VA, Voss K, Errington ML, Bliss TV, Gurd JW. Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. 93, 10452-6.

Rothman, R.B. and Baumann, M.H. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur. J. Pharmacol*. 2003. 479, 23-40.

Salzet M, Breton C, Bisogno T, Di Marzo V. Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response. *Eur J Biochem*. 2000. 267, 4917-27.

Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol*. 2001. 24, 107-29.

Sayas CL, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F. The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem* 1999. 274, 37046-37052.

Schulze C, Smales C, Rubin LL, Staddon JM. Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem* 1997. 68, 991-1000.

Self DW, McClenahan AW, Beitner-Johnson D, Terwilliger RZ, Nestler EJ. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to heroin self-administration. *Synapse*. 1995. 21, 312-8.

Self DW. Anandamide: a candidate neurotransmitter heads for the big leagues. *Nat Neurosci*. 1999. 2, 303-4.

Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Ann N Y Acad Sci*. 2003. 1003, 36-52.

Shalev U, Grimm JW, Shaham Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev*. 2002. 54, 1-42.

Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997. 17, 7503-22.

Sibley DR, Monsma FJ Jr, Shen Y. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int Rev Neurobiol*. 1993. 35, 391-415.

Simon D. and Burns E., *The corner: a year in the life of an inner-city neighborhood*, Broadway Books (Random House), New York (1997).

Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, Beutler E, Cravatt BF. A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99, 8394-9.



Smith EM and Watford M. Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. Sequence similarity to kidney-type glutaminase, *J. Biol. Chem.* 1990. 265, 10631–10636.

Smith KM, Bauer L, Fischer M, Barkley R, Navia BA. Identification and characterization of human NR4A2 polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005. 133, 57-63.

Sora I. Study of drug dependence using genetically modified animals] *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 2001. 21, 163-4.

Soria G, Mendizábal V, Touriño C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology.* 2005. 30, 1670-80.

Sousa F.C., Gomes P.B., Macedo D.S., Marinho M.M. and Viana G.S., Early withdrawal from repeated cocaine administration upregulates muscarinic and dopaminergic D2-like receptors in rat neostriatum, *Pharmacol Biochem Behav* 1999. 62, 15–20.

Steinmetz M, Quentin T, Poppe A, Paul T, Jux C. Changes in expression levels of genes involved in fatty acid metabolism: upregulation of all three members of the PPAR family (alpha, gamma, delta) and the newly described adiponectin receptor 2, but not adiponectin receptor 1 during neonatal cardiac development of the rat. *Basic Res Cardiol.* 2005. 100, 263-9.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. 215, 89-97.

Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC. Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci.* 2001. 4, 1217-23.

Tigyi G, Miledi R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1992. 267, 21360- 21367.

Tilley MR, Cagniard B, Zhuang X, Han DD, Tiao N, Gu HH. Cocaine reward and locomotion stimulation in mice with reduced dopamine transporter expression. *BMC Neurosci.* 2007. 8, 42.

Unterwald E.M., Cox B.M., Kreek M.J., Cote T.E. and Izenwasser S. Chronic repeated cocaine administration alters basal and opioid-regulated adenylyl cyclase activity, *Synapse* 1993. 15, 33–38.

Unterwald E.M., Ho A., Rubinfeld J.M. and Kreek M.J. Time course of the development of behavioral sensitization and dopamine receptor up-regulation during binge cocaine administration, *J Pharmacol Exp Ther* 1994. 270, 1387–1396.

Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D, Girault JA. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102, 491-6.

Van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signalling pathways mediated by G proteins. *Cell* 1989. 59, 45-54.



van der Bend RL, Brunner J, Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH. Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J* 1992. 11, 2495-2501.

van der Bend RL, de Widt J, van Corven EJ, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. Metabolic conversion of the biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1992. 1125, 110-112.

van Leeuwen FN, Olivo C, Grivell S, Giepmans BN, Collard JG. Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*. 2003..278, 400-406.

Waddington JL, Lane A, Scully P, Meagher D, Quinn J, Larkin C, O'Callaghan E. Early cerebrocraniofacial dysmorphogenesis I schizophrenia: a lifetime trajectory model from enurodevelopmental basis to neuroprogressive process. *J Psychiatr Res*. 1999. 33, 477-489.

Warner EA. Cocaine abuse. *Ann Intern Med*. 1993. 119, 226-35.

Weiner JA, Chun J. Schwann cell survival mediated by the signalling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999. 96, 5233-5238.

Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Scherer SS, Chun J. Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated liophosphatidic acid signalling. *J Neurosci* 2001. 21, 7069-7078.

Wise RA. Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res*. 1978. 152, 215-47.

Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*. 2004. 5, 483-94.

Wolf M. E., Sun X., Mangiavacchi S. and Chao S. Z. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 2004. 47, 61-79.

Wu M, Brudzynski SM, Mogenson GJ. Functional interaction of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens in the regulation of locomotion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993. 71, 407-13.

Yamaguchi M, Suzuki T, Abe S, Hori T, Kurita H, Asada T, Okado N, Arai H. Repeated cocaine administration differentially affects NMDA receptor subunit (NR1, NR2A-C) mRNAs in rat brain. *Synapse* 2002. 46, 157-69.

Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol*. 1999. 59, 279-98.

Yue J, Yokoyama K, Balazs L, Baker DL, Smalley D. Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell signal* 2004. 16, 385-399.

Zahm DS. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000. 24, 85-105.

Zavala AR, Biswas S, Harlan RE, Neisewander JL. Fos and glutamate AMPA receptor subunit coexpression associated with cue-elicited cocaine-seeking behavior in abstinent rats. *Neuroscience*. 2007. 145, 438-52.