

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD 2ª ANUALIDAD 3ª ANUALIDAD X FINAL X

Número Expediente: PNSD #2009/026

Investigador Principal: Rafael MALDONADO

Otros Investigadores: Josep-Eladi BAÑOS DIEZ, Miquel-Àngel SERRA BELTRÁN, Elena MARTÍN GARCÍA, Javier GUTIÉRREZ CUESTA, Xavier NADAL ROURA, Simona Andreea BURA, Emma PUIGHERMANAL PUIGVERT, María Juliana OREJARENA SERRANO, Ainhoa PLAZA ZABALA, Marta LINARES LÓPEZ, Roberto CABRERA ORTEGA, Montserrat ABELLA MONLEÓN, Alicia FABRA AVILÉS

Título Proyecto o subproyecto NUEVOS MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BÚSQUEDA DE COCAÍNA: ESTUDIOS COMPORTAMENTALES Y BIOQUÍMICOS

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto) NUEVOS MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BÚSQUEDA DE COCAÍNA

Organismo: UNIVERSITAT POMPEU FABRA

Centro: Laboratorio de Neurofarmacología

Departamento: Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud

Comunidad Autónoma: CATALUNYA

Duración: 3 AÑOS

Fecha de inicio: Octubre 2009

Fecha de finalización: Octubre 2012

Año Convocatoria: 2009

Área Temática: Investigaciones sobre estrategias terapéuticas buscando nuevos métodos de tratamiento, incluyendo identificación de dianas terapéuticas y diseño de nuevos fármacos

Palabras Clave: Cocaína, recaída, modelos animales, receptores y péptidos opioides, expresión génica

RESUMEN: (Objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2.000 palabras)

Durante el tercer año de proyecto nuestro trabajo se ha centrado en el objetivo 2. En este segundo objetivo se ha investigado la participación del sistema opioide endógeno en los efectos reforzantes de la cocaína mediante la técnica de condicionamiento operante en ratones mu knockout (KO) constitutivos. Durante esta última fase del proyecto se ha completado el número de animales para cada grupo experimental de ratones knockout constitutivos del receptor mu. Además, se han finalizado los estudios de comportamiento en este objetivo de los ratones KO para el receptor opioide delta y el precursor pre-proencefalina.

Objetivo 2a. Investigar la participación de diferentes componentes del sistema opioide endógeno en la recaída a un comportamiento de búsqueda de cocaína mediante el empleo de ratones knockout constitutivos (subproyecto 1, objetivo 2a).

En una primera serie experimental, se investigó la participación del sistema opioide endógeno en los efectos reforzantes de la cocaína mediante la técnica de condicionamiento operante en ratones knockout (KO) constitutivos deficientes en el receptor opioide mu. Los ratones fueron entrenados en los programas de refuerzo de razón fija 1 y 3 (FR1 y FR3) para una autoadministración operante de cocaína (0.5 mg/kg). Durante los primeros días de entrenamiento en razón fija 1, los ratones KO presentaron un menor número de infusiones que los WT. Después de este período de entrenamiento en FR1 y FR3 los animales se expusieron a una sesión de razón progresiva (PR) para evaluar su motivación en la obtención de la cocaína. Nuestros resultados muestran que los ratones KO presentan una tendencia a una menor motivación que los animales wild-type (WT). Los ratones que alcanzaron los criterios de adquisición fueron sometidos a un período de extinción. La recaída a la autoadministración de cocaína se indujo por factores ambientales asociados a la droga en ratones que mostraron extinción. Ambos genotipos recayeron en la búsqueda de cocaína, no obstante, la recaída en los ratones KO fue menor que la de los ratones control WT. En resumen, el receptor opioide mu está implicado en los efectos reforzantes de la cocaína y la dosis de 0.5 mg/kg/infusión es menos reforzante en los ratones mutantes. A continuación se realizaron cortes de los cerebros de estos animales y ensayos de inmunofluorescencia de los niveles de expresión de c-fos, analizando la activación neuronal en diversas áreas cerebrales relacionadas con los procesos de recompensa (corteza prelímbica, estriado, núcleo accumbens, amígdala e hipocampo). No se observaron diferencias significativas en la activación neuronal, de las diferentes áreas estudiadas, entre los ratones KO y los controles WT.

En una segunda serie experimental, se evaluaron las propiedades adictivas de la cocaína en ratones deficientes para el receptor opioide delta. Estos ratones KO y sus controles WT fueron entrenados para autoadministrarse cocaína en sesiones FR1, FR3 y PR. Nuestros resultados muestran

que los ratones KO presentan una menor motivación por la cocaína que los ratones controles WT. Los ratones que alcanzaron los criterios de fueron sometidos a un período de extinción. La recaída a la autoadministración de cocaína se indujo por factores ambientales asociados a la droga. Los resultados demuestran que el receptor opioide delta está implicado en los efectos reforzantes de la cocaína y que existen diferencias significativas entre genotipos en la recaída a la búsqueda de la droga. A continuación se realizaron cortes de los cerebros de estos animales, ensayos de inmunofluorescencia de los niveles de expresión de c-fos, analizando la activación neuronal en diversas áreas cerebrales relacionadas con los procesos de recompensa (corteza prefrontal, estriado, núcleo accumbens, amígdala e hipocampo). Nuestros resultados muestran que en las áreas cerebrales del estriado, núcleo accumbens y la corteza prefrontal, los animales KO presentan una menor activación neuronal evidenciada por una menor expresión de c-fos.

En una tercera serie experimental, se evaluaron las propiedades adictivas de la cocaína en ratones deficientes para el precursor de la proencefalina. Estos ratones KO y sus controles WT fueron entrenados para autoadministrarse cocaína en sesiones de FR1, FR3 y PR. Los ratones KO presentan una menor motivación por la cocaína en comparación con los ratones controles WT. Los ratones fueron sometidos a un período de extinción y la recaída a la autoadministración de cocaína se indujo por factores ambientales asociados a la droga. Los resultados demuestran que el precursor pre-proencefalina está implicado en los efectos reforzantes de la cocaína. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la recaída a la búsqueda de la droga.

Objetivo 2b. Evaluar la participación de los receptores opioides mu, delta y de la proencefalina en la auto-administración frustrada de cocaína (subproyecto 1, objetivo 2b).

En una primera serie experimental se utilizaron ratones knockout deficientes en el receptor opioide mu. Tras la fase de entrenamiento y adquisición del condicionamiento operante mantenido por comida en razón fija 1, 5 y 10 (FR1, FR5 y FR10), los animales fueron sometidos a 10 sesiones en razón progresiva (PR). Durante estas sesiones no se observaron diferencias significativas entre los ratones WT y KO. Después de estas sesiones, se realizó una última sesión donde los animales que alcanzaron la razón 150 de la serie anteriormente descrita fueron divididos en tres grupos experimentales: control positivo, grupo de frustración y grupo de desesperación aprendida. Los ratones expuestos a la administración frustrada de una recompensa, después de alcanzado un punto de respuestas de 150, perseveraron en las respuestas en la palanca activa. Por otro lado, los ratones KO incrementaron de manera significativa dicha perseverancia en comparación con el resto de grupos. Los resultados mostraron también un mayor comportamiento agresivo en el grupo de frustración KO en comparación con el resto de grupos.

En una segunda serie experimental, se realizó el mismo procedimiento con animales WT y KO deficientes en el receptor opioide delta. Del mismo modo que con los ratones KO deficientes en el receptor opioide mu, los animales frustrados perseveraron en la manipulación de la palanca activa más que sus controles, siendo los animales KO frustrados los que presentaron una mayor

perseverancia respecto al resto de grupos durante los 10 minutos adicionales posteriores a la razón 150. Los animales frustrados KO no presentaron un mayor comportamiento agresivo tras esta frustración.

En una tercera serie experimental, se llevó a cabo un abordaje experimental similar para evaluar las consecuencias de un comportamiento operante frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína en ratones KO deficientes en el receptor opioide μ y sus controles WT. En primer lugar, los ratones fueron entrenados en patrones de refuerzo FR1, FR3 y PR para obtener cocaína (0.5 mg/Kg/infusión). Tras 5 días de sesiones en PR se realizó una sesión adicional, donde aquellos ratones que alcanzaron un índice de respuestas de 40 se dividieron en 2 grupos experimentales: los que fueron sometidos al paradigma de frustración y sus controles positivos. Los datos muestran que los ratones expuestos a la administración frustrada de cocaína tras completar la razón 40 perseveraron en las respuestas del orificio activo sin diferencias entre genotipo. Asimismo, se observó un comportamiento agresivo mayor en el grupo de frustración, que resultó ser más estable en el grupo KO.

En una cuarta serie experimental, se llevó a cabo un abordaje experimental similar para evaluar las consecuencias de un comportamiento operante frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína en ratones KO del receptor opioide delta y sus controles WT. Los datos muestran que los ratones expuestos a la administración frustrada de cocaína tras completar la razón 40 de la serie de razón progresiva, perseveraron en las respuestas del orificio activo sin diferencias entre genotipos. El grupo de frustración mostró una tendencia más agresiva comparado con el grupo control.

Nuestros resultados demuestran que la administración frustrada del reforzante, en este caso comida y/o cocaína, provoca cambios comportamentales en los ratones sometidos a dicha frustración, que se manifiestan en un incremento de la respuesta operante tras la frustración y de la agresividad. Al mismo tiempo, nuestros resultados también demuestran el papel específico de los receptores opioides μ y delta en dicha frustración provocada por la ausencia de refuerzo.

Objetivo 2c. Investigar la participación de poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en la recaída a un comportamiento de búsqueda de droga mediante el empleo de ratones knockout condicionales (subproyecto 1, objetivo 2c).

Se utilizaron ratones knockout condicionales, denominados ratones μ GABA $-/-$, que no expresan el receptor opioide μ en neuronas gabaérgicas principalmente localizadas en el sistema límbico. De acuerdo con la literatura, se asumió que un modelo animal de autoadministración intravenosa de heroína sería más adecuado que la autoadministración de otras drogas de abuso por ser el receptor μ opioide el principal blanco de esta droga. En una primera serie experimental, se estudió la curva de dosis respuesta y la recaída inducida por el estímulo condicionado. Se utilizó un diseño intra-sujetos en el que las dosis de heroína se iban presentando en orden decreciente en un programa de razón fija 1. Después de 21 días de autoadministración intravenosa de heroína con

diferentes dosis (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 y 0.006 mg/kg/infusión de 23 μ l) se realizó una sesión de PR para evaluar la motivación por la búsqueda de heroína, tras la cual los animales fueron expuestos a un período de extinción. Después de este período de extinción se sometió a los animales a una prueba de recaída inducida por la presentación del estímulo condicionado asociado a la obtención de la droga. Los resultados obtenidos en la adquisición del comportamiento operante mantenido por heroína muestran que los ratones knockout condicionales mu GABA -/- presentaron mayor número de inyecciones que los ratones WT durante los primeros días de adquisición con la dosis de 0.1 mg/kg/infusión. Los ratones mu GABA -/- presentaron mejor discriminación entre el agujero activo e inactivo que los ratones WT. La curva dosis-respuesta presenta un aplanamiento en los animales WT en comparación con los ratones mu GABA -/-. Ambos genotipos presentaron niveles de respuesta más elevados con dosis menores de la droga. La motivación por la búsqueda de heroína con la dosis de 0.0125 mg/kg/infusión también es mayor en los ratones mu GABA -/- que en los WT. Después de evaluar a los animales en la prueba de motivación por la heroína, entran en una fase de extinción y, una vez finalizada ésta, se evaluó en los animales la recaída inducida por un estímulo condicionado asociado a la droga. Los ratones mu GABA -/- presentaron un mayor número de respuestas en el agujero activo que durante la fase de extinción y que los ratones WT durante el test de recaída.

En una segunda serie experimental se utilizó la dosis -óptima de heroína teniendo en cuenta la serie experimental anterior (0.006 mg/kg/infusión). Después de 10 días de autoadministración intravenosa de heroína en FR1 se realizó una sesión de razón progresiva seguida de una fase de extinción y de un test de recaída. La adquisición del comportamiento operante mantenido por heroína con la dosis de 0.006 mg/kg/infusión fue similar en los dos genotipos. Los niveles de discriminación y estabilidad de la respuesta operante son similares en los dos genotipos. La motivación por la búsqueda de heroína (0.006 mg/kg/infusión) también es mayor en los ratones mu GABA -/- que en los WT. Al finalizar la fase de extinción, se evaluó la recaída inducida por un estímulo condicionado asociado a la droga. Tanto los ratones mu GABA -/- como los WT presentaron mayor número de respuestas en el agujero activo durante la recaída que durante la fase de extinción.

En una tercera serie experimental, se estudió en estos animales knockout condicionales la adquisición del comportamiento operante mantenido por comida de alta palatabilidad con el objetivo de estudiar la participación de los receptores mu opiodes localizados en neuronas gabaérgicas en los efectos reforzantes de una sustancia natural. También se diseñó con el objetivo de tener un control de los experimentos 1 y 2 realizados con heroína y poder comprobar si el fenotipo de los animales mutantes era o no específico de la droga. Los resultados obtenidos muestran niveles similares de adquisición y de esta respuesta operante en ambos genotipos. Es interesante destacar que los ratones mu GABA -/- presentaron mayor número de respuestas en el agujero activo durante el periodo de time-out cuando el reforzador no es accesible.

Objetivo 2d. Investigar la participación de poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en las respuestas comportamentales y bioquímicas producidas por un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de droga mediante el empleo de ratones knockout condicionales (subproyecto 1, objetivo 2d).

Este objetivo se alcanzó con el estudio detallado de la fase de extinción de un comportamiento de autoadministración de heroína en ratones knockout condicionales deficientes en los receptores mu opioides localizados en las neuronas gabaérgicas, siguiendo el protocolo descrito en el experimento 1 del objetivo 2c. Después de evaluar a los animales en sesiones de razón fija y de razón progresiva, estos entraron en una fase de extinción de la conducta de búsqueda de la droga, donde aprenden que su conducta no tiene como consecuencia la obtención de la misma. El primer día de extinción los ratones knockout condicionales muestran un incremento del número de respuestas para la obtención de la droga en comparación con el grupo control. Este incremento de la respuesta en ausencia de la droga corresponde a un estado de frustración producido por la ausencia del reforzador. A medida que pasan los días la respuesta de los animales va bajando progresivamente hasta que llega al mismo nivel que la respuesta en el agujero inactivo. Se pierde la discriminación entre los agujeros activo e inactivo y se reduce la respuesta de búsqueda de la droga hasta niveles inferiores al 30% de la respuesta que se presentaba en la fase de adquisición. Los animales WT no presentan este incremento de la respuesta el primer día que se retira la droga y mantienen un nivel de respuesta bajo durante toda la fase de extinción de la respuesta operante.

Estos resultados reflejan un **cambio de conducta** que aparece en ausencia de los receptores opioides mu en neuronas gabaérgicas cuando los animales son expuestos a una frustración al no conseguir la droga tras la realización de la conducta operante.

MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO SOBRE LOS PROYECTADOS Y SU JUSTIFICACIÓN:

En relación al objetivo 2, no se han realizado cambios sustanciales del planteamiento inicial de la metodología y el plan de trabajo proyectado. En el subproyecto 2, se incorporó un grupo control adicional, *Yoked*, al conjunto de grupos ya planificados para la correcta interpretación de los resultados del estudio genómico, necesario para poder discriminar el efecto de la administración no contingente del reforzante.

ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: (Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

Se han publicado o están en vías de publicación los siguientes artículos:

Burokas A, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Maldonado R. Operant model of frustrated expected reward in mice. *Addiction Biology*, 2012 Jul; 17(4):770-82. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00423.x. [Epub ahead of print] PMID: 22264360

Fernández-Castillo N, Orejarena MJ, Ribasés M, Blanco E, Casas M, Robledo P, Maldonado R, Cormand B. Active and passive MDMA ('ecstasy') intake induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Genes Brain & Behavior*, 2012 Feb; 11(1):38-51. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00735.x. Epub 2011 Nov 16. PMID: 21951708.

Burokas A, Martín-García E, Gutiérrez-Cuesta J, Rojas S, Herance R, Gispert JD, Maldonado R. Depressive-like behavior induced by chronic stress in CB1 knockout mice: a PET study with [¹¹C]-DASB. *Molecular Imaging*, in preparation (December 2012)

Teixeira CM, Martín ED, Sahún I, Masachs N, Pujadas L, Corvelo A, Bosch C, Rossi D, Martínez A, Maldonado R, Dierssen M, Soriano E. Overexpression of Reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Nov;36(12):2395-405. doi: 10.1038/npp.2011.153. Epub 2011 Aug 3. PMID:21814183

Robledo P, Berrendero F, Maldonado R. Role of the endogenous cannabinoid system in addiction using genetic animal models. Review. *Current Opinion in Neurobiology*, submitted (December 2012)

Martín-García E, Fernández-Castillo N, Burokas A, Gutiérrez-Cuesta J, Ribasés M, Cormand B, Maldonado R. Operant model of frustrated expected chocolate reward induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Addiction Biology*, in preparation (December 2012)

Fernández-Castillo N, Gutiérrez-Cuesta J, Burokas A, Martín-García E, Ribasés M, Maldonado R, Cormand B. Operant model of frustrated expected cocaine reward induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Addiction Biology*, in preparation (December 2012)

También se han publicado los siguientes artículos:

Guegan T, Cutando L, Ayuso E, Santini E, Fisone G, Bosch F, Martínez A, Valjent E, Maldonado R, Martín M. Operant behavior to obtain palatable food modifies neuronal plasticity in the brain reward circuit. *European Neuropsychopharmacology*, 2012 May 22. [Epub ahead of print]. PMID: 22612989

Guegan T, Cutando L, Gangarossa G, Santini E, Fisone G, Martinez A, Valjent E, Maldonado R, Martin M. Operant behavior to obtain palatable food modifies ERK activity in the brain reward circuit. *European Neuropsychopharmacology*, 2012 March 11. [Epub ahead of print]. PMID: 22580057

Además, los resultados derivados de este proyecto han sido presentados en pósters en diversos congresos internacionales tales como:

- July 2012, Barcelona. 8th FENS forum of European Neuroscience.

Presentation: Poster

Elena Martín-García, Lucie Bourgoin, Adeline Cathala, Umberto Spampinato, Rafael Maldonado, Pier Vincenzo Piazza, Giovanni Marsicano and Véronique Deroche-Gamonet *Differential control of cocaine reinforcing effects by CB1 receptors on excitatory and inhibitory transmissions.*

- September 2012, Lecce/Italy. Workshop on Eating Behaviour and Obesity by European Behavioural Pharmacology Society.

Presentation: oral communication

A. Burokas, E. Martín-García, J. Gutiérrez-Cuesta, S. Mancino, M. Gutiérrez and R. Maldonado. *Modeling food addictin in mice.*

OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)

OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro proyecto de investigación consiste en evaluar los mecanismos neurobiológicos implicados en los procesos de recaída al consumo de cocaína y en las alteraciones que aparecen en el adicto en ausencia de dicho consumo. Para ello planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de un nuevo modelo operante que permita estudiar en ratones un comportamiento de frustración en situaciones de búsqueda compulsiva de cocaína (subproyecto 1, objetivo 1)
- Evaluar las consecuencias de un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína a nivel de la ansiedad y la agresividad (subproyecto 1, objetivo 1)
- Evaluar las consecuencias neuroquímicas de un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína (subproyecto 1, objetivo 1)
- Evaluar las consecuencias genómicas de un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína (subproyecto 2, ver objetivos específicos descritos en este subproyecto)
- Investigar la participación de diferentes componentes del sistema opioide endógeno en la recaída a un comportamiento de búsqueda de cocaína mediante el empleo de ratones knockout constitutivos (subproyecto 1, objetivo 2a).
- Investigar la participación de diferentes componentes del sistema opioide endógeno en las respuestas comportamentales y bioquímicas producidas por un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína mediante el empleo de ratones knockout constitutivos (subproyecto 1, objetivo 2b).
- Investigar la participación de poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en la recaída a un comportamiento de búsqueda de cocaína mediante el empleo de ratones knockout condicionales (subproyecto 1, objetivo 2c).
- Investigar la participación de poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en las respuestas comportamentales y bioquímicas producidas por un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína mediante el empleo de ratones knockout condicionales (subproyecto 1, objetivo 2d).

OBJETIVOS CONCRETOS ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto)

Durante la última fase del proyecto se ha completado el número de animales para cada grupo experimental de ratones knockout constitutivos del receptor mu. Además, se han finalizado los estudios de comportamiento en este objetivo de los ratones KO para el receptor opioide delta y el precursor pre-proencefalina (objetivos 2a y 2b), y se han estudiado poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en la recaída a un comportamiento de búsqueda de droga así como en las respuestas comportamentales y bioquímicas producidas por un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de droga mediante el empleo de ratones knockout condicionales (objetivos 2c y 2d).

Objetivo 2a. Investigar la participación de diferentes componentes del sistema opioide endógeno en la recaída a un comportamiento de búsqueda de cocaína mediante el empleo de ratones knockout constitutivos (subproyecto 1, objetivo 2a).

Se investigó la participación del sistema opioide endógeno en los efectos reforzantes de la cocaína mediante la técnica de condicionamiento operante en ratones mu KO constitutivos. Antes de iniciar el condicionamiento operante se implantó un catéter intravenoso en la yugular de los ratones para que pudiesen recibir la droga. Después, los ratones fueron entrenados en los programas de refuerzo de razón fija 1 y 3 (figura 1). La dosis de cocaína autoadministrada por los ratones en cada infusión fue de 0.5 mg/kg. Durante los primeros días de entrenamiento en razón fija 1, los ratones KO presentaron un menor número de infusiones que los WT (KO = 4.54 ± 1.02 y WT = 13.15 ± 2.90). En resumen, los ratones mu KO presentan menor respuesta operante para la obtención de un reforzador como la cocaína bajo el patrón de FR1. La dosis de 0.5 mg/kg/infusión es menos reforzante en los ratones mutantes durante los primeros días de autoadministración.

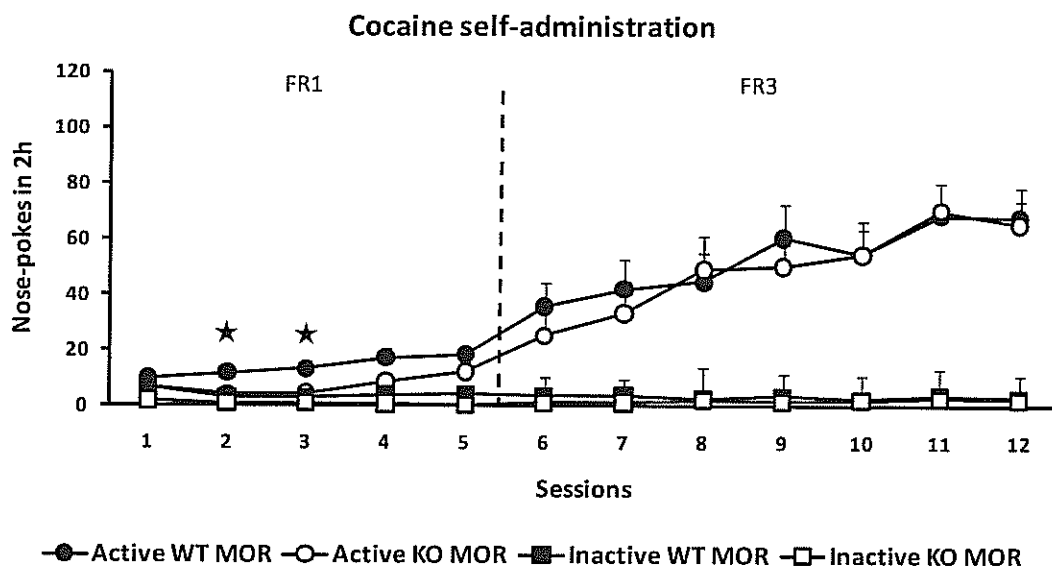


Figura 1. Adquisición del comportamiento operante mantenido por cocaína en ratones knockout constitutivos del receptor opioide mu (KO MOR) y de los correspondientes animales wild-type (WT MOR). Número de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 2 h con la dosis de 0.5 mg/kg/infusión durante 12 días. Los 5 primeros días corresponden a un entrenamiento en razón fija 1 mientras que los 7 últimos días corresponden a un entrenamiento en razón fija 3. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=11 en el grupo de KO MOR y n=13 en el grupo de ratones WT MOR). * $p < 0.05$ vs. KO MOR.

Después de este período de entrenamiento en FR1 y FR3 los animales se expusieron a una sesión más de razón progresiva. En esta sesión la secuencia de respuestas necesarias para obtener un pellet aumentará de acuerdo con la siguiente secuencia predeterminada: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. Esta sesión permite evaluar la motivación de los animales en la obtención de la cocaína (figura 2). Nuestros resultados muestran que los ratones KO presentan una tendencia a una menor motivación que los animales WT.

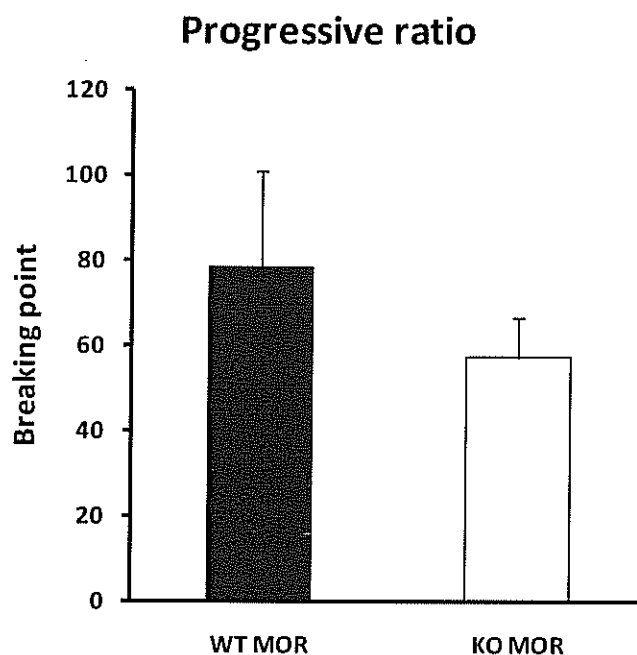


Figura 2: Condicionamiento operante mantenido por cocaína en razón progresiva. Razón alcanzada en la sesión bajo razón progresiva durante 3 h por los ratones WT y KO del receptor opioide mu. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=11 en el grupo de KO MOR y n=13 en el grupo de ratones WT MOR).

Los ratones que alcanzaron los criterios de adquisición fueron sometidos a un período de extinción hasta que redujeron el comportamiento operante a un valor inferior o igual al 30% de los niveles durante la adquisición mantenidos durante 3 días (máximo 15 días). La recaída a la autoadministración de cocaína se indujo por factores ambientales asociados en ratones que mostraron extinción (figura 3). Ambos genotipos recayeron en la búsqueda de cocaína, no obstante, la recaída en los ratones KO MOR fue significativamente menor que la de los control WT.

Cue-induced reinstatement

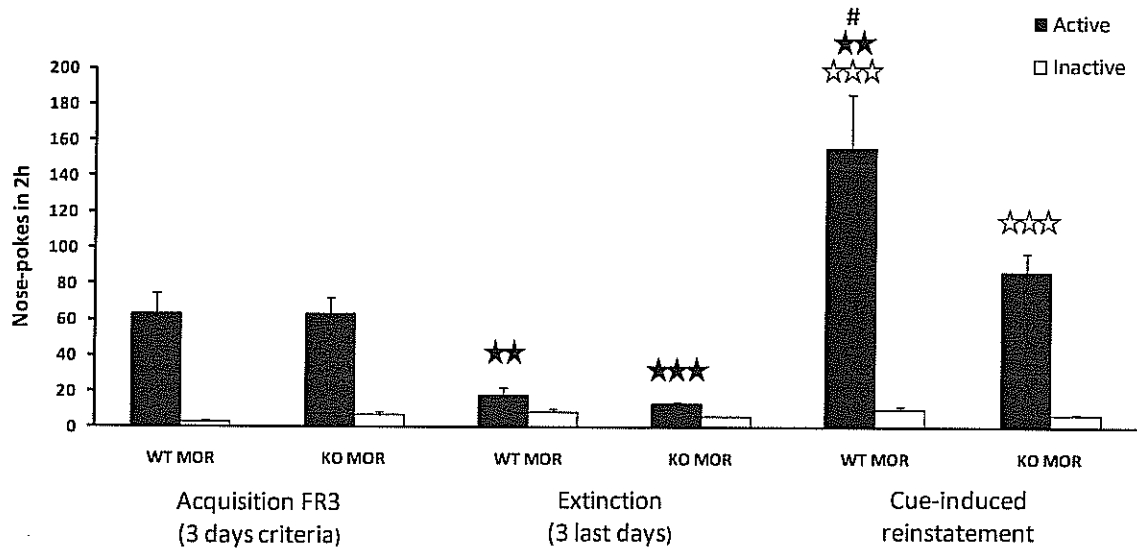
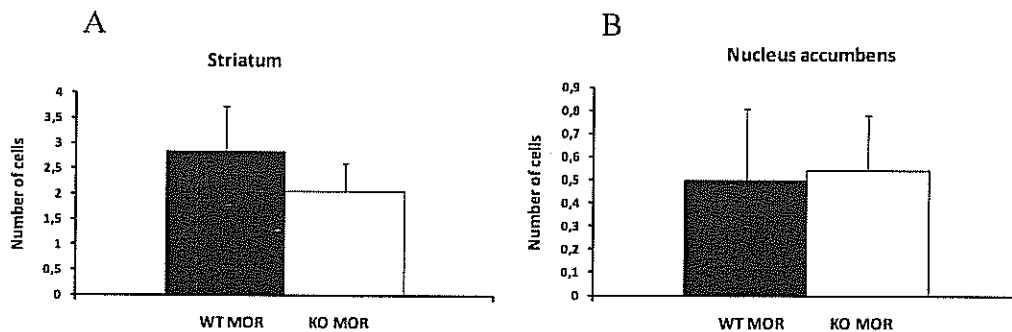


Figura 3: Recaída a la búsqueda de cocaína en ratones control (WT MOR) y en ratones knockout deficientes para el receptor opioide mu (KO MOR). Representación del promedio de los 3 días del entrenamiento en que los animales alcanzaron el criterio de adquisición, del promedio de los 3 días que se alcanzó el criterio de extinción y la respuesta operante durante la recaída a la búsqueda de cocaína inducida por el estímulo condicionado. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=10 en ambos grupos). ** p<0.01 vs. adquisición, *** p<0.001 vs. adquisición, ☆☆☆ vs. extinción, # p<0.05 vs. KO MOR.

En resumen, el receptor mu opioide está implicado en los efectos reforzantes de la cocaína y la dosis de 0.5 mg/kg/infusión es menos reforzante en los ratones mutantes. La menor respuesta y recaída de los ratones KO MOR no se explica por posibles dificultades en el aprendizaje operante ya que el 90 % ha adquirido los criterios de estabilidad y discriminación, tal como se demuestra en el porcentaje de adquisición de la respuesta operante mantenida por cocaína.

Tras completar la fase comportamental se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de los niveles de expresión de c-fos en cortes de los cerebros de estos animales, analizando así la activación neuronal en diversas áreas cerebrales relacionadas con los procesos de recompensa (corteza prelámbica, estriado, núcleo accumbens, amígdala e hipocampo) (figura 4 A,B,C,D,E,F,G).



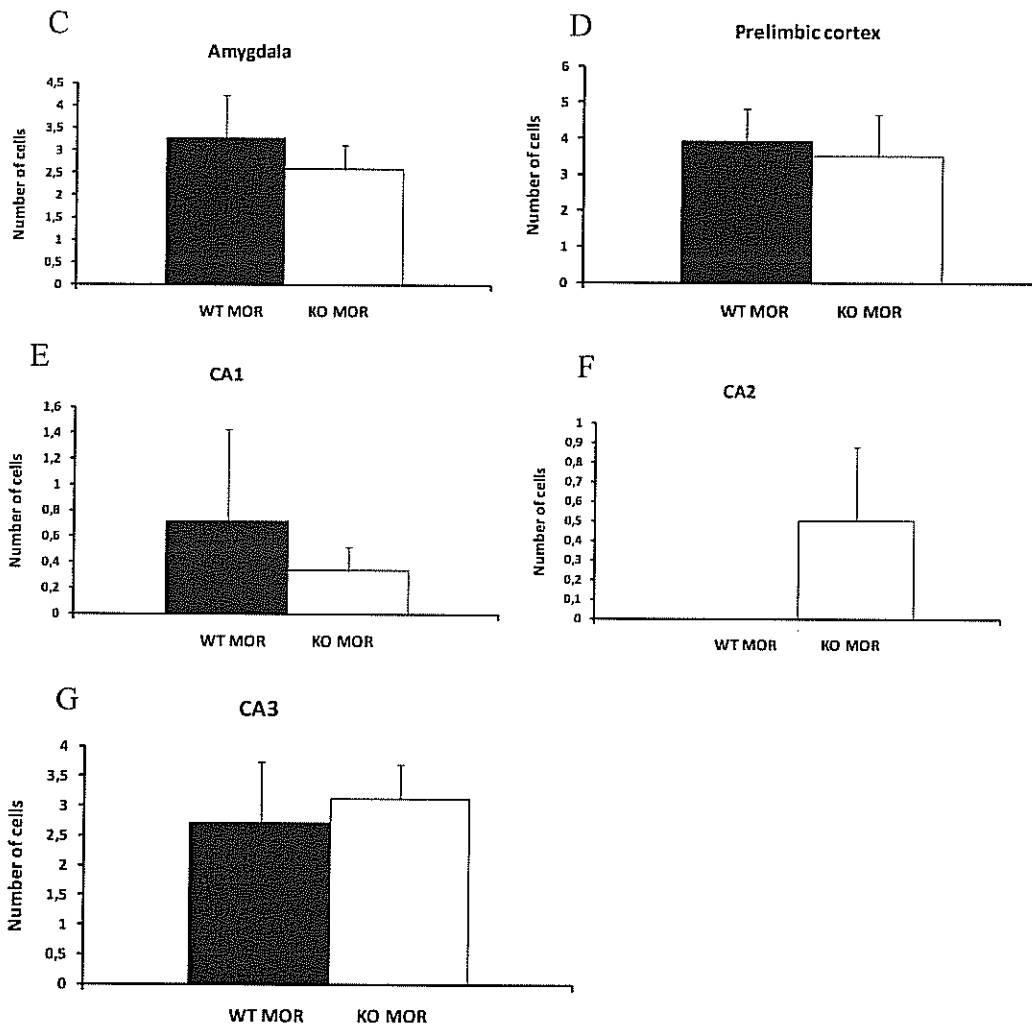


Figura 4: Niveles de expresión de c-fos en animales knockout del receptor opioide mu (KO MOR) y controles (WT MOR). (A) estriado, (B) núcleo accumbens, (C) amígdala, (D) corteza prelímbica, (E) región CA1 del hipocampo, (F) región CA2 del hipocampo, (G) región CA3 del hipocampo. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=5 en WT MOR, n=7 en KO MOR).

No se observaron diferencias significativas en la activación neuronal, de las diferentes áreas estudiadas, entre los ratones KO MOR y los controles WT MOR.

Utilizando una aproximación experimental similar, se han evaluado las propiedades adictivas de la cocaína en ratones deficientes para el receptor opioide delta (KO DOR). Estos ratones KO y sus controles WT fueron entrenados para autoadministrarse cocaína durante 5 días en sesiones de FR1 y 7 días en sesiones de FR3 (figura 5).

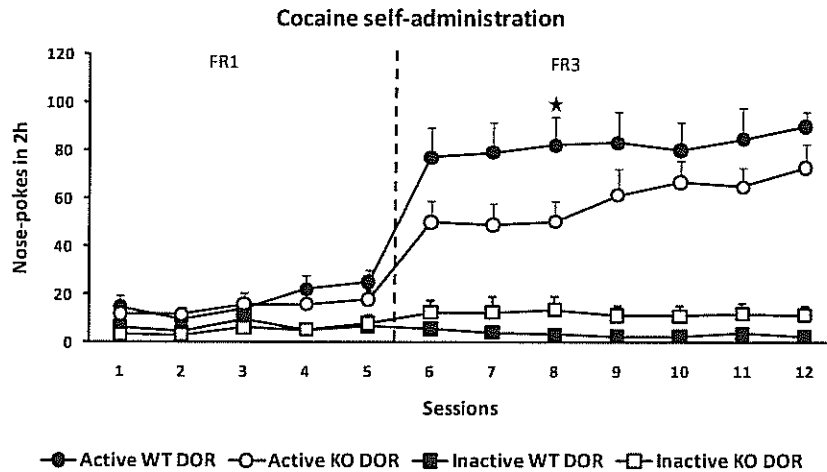


Figura 5. Adquisición del comportamiento operante mantenido por cocaína en ratones knockout constitutivos del receptor opiode delta (KO DOR) y de los correspondientes animales wild-type (WT DOR). Número de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 2 h con la dosis de 0.5 mg/kg/infusión durante 12 días. Los 5 primeros días corresponden a un entrenamiento en razón fija 1 mientras que los 7 últimos corresponden a un entrenamiento en razón fija 3. Los datos están expresados en media \pm SEM ($n=18$ en el grupo de KO DOR y $n=14$ en el grupo de ratones WT DOR). $\star p < 0.05$ vs. KO DOR.

También fueron expuestos a una sesión de razón progresiva (figura 6). Nuestros resultados muestran que los ratones KO DOR presentan una menor motivación por la cocaína que los ratones controles WT.

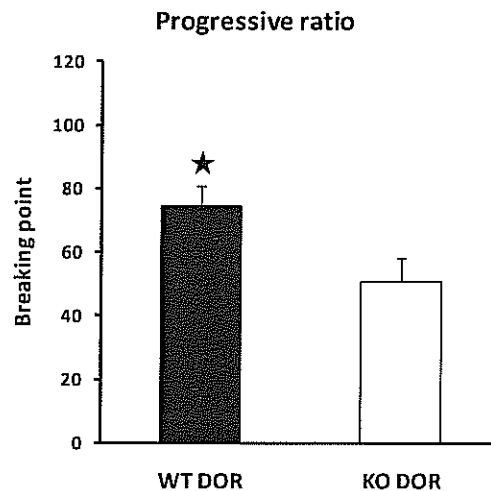


Figura 6: Condicionamiento operante mantenido por cocaína en razón progresiva. Razón alcanzada en la sesión bajo razón progresiva durante 3 h por los ratones WT y KO del receptor opiode delta. Los datos están expresados en media \pm SEM ($n=18$ en el grupo de KO DOR y $n=14$ en el grupo de ratones WT DOR). $\star p < 0.05$ vs. KO DOR.

Los ratones que alcanzaron los criterios de adquisición (73% del grupo WT DOR, 72% del grupo KO DOR) fueron sometidos a un período de extinción hasta que redujeron el comportamiento operante y obtuvieron un valor inferior o igual a un 30% de los niveles durante la adquisición (máximo 15 días). La recaída a la autoadministración de cocaína se indujo por factores ambientales asociados en ratones que mostraron extinción por exposición de los mismos a los factores ambientales previamente asociados a la administración de droga (figura 7).

Cue-induced reinstatement

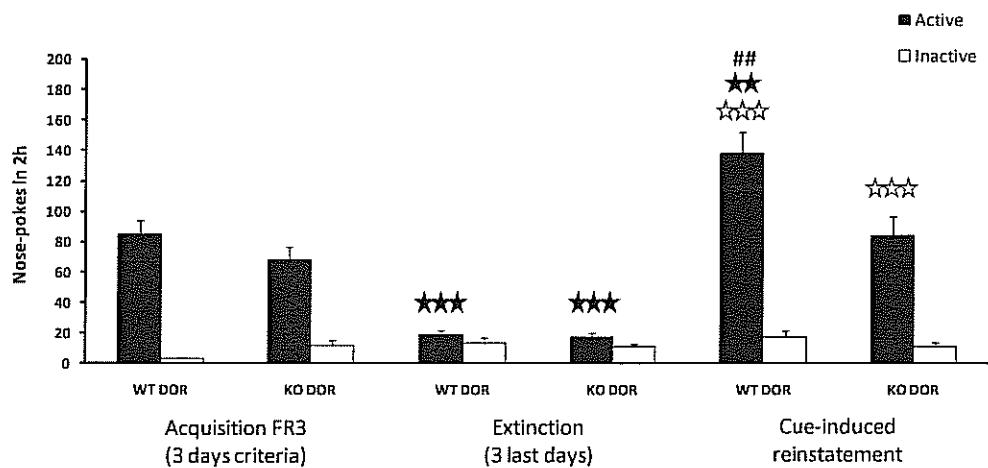
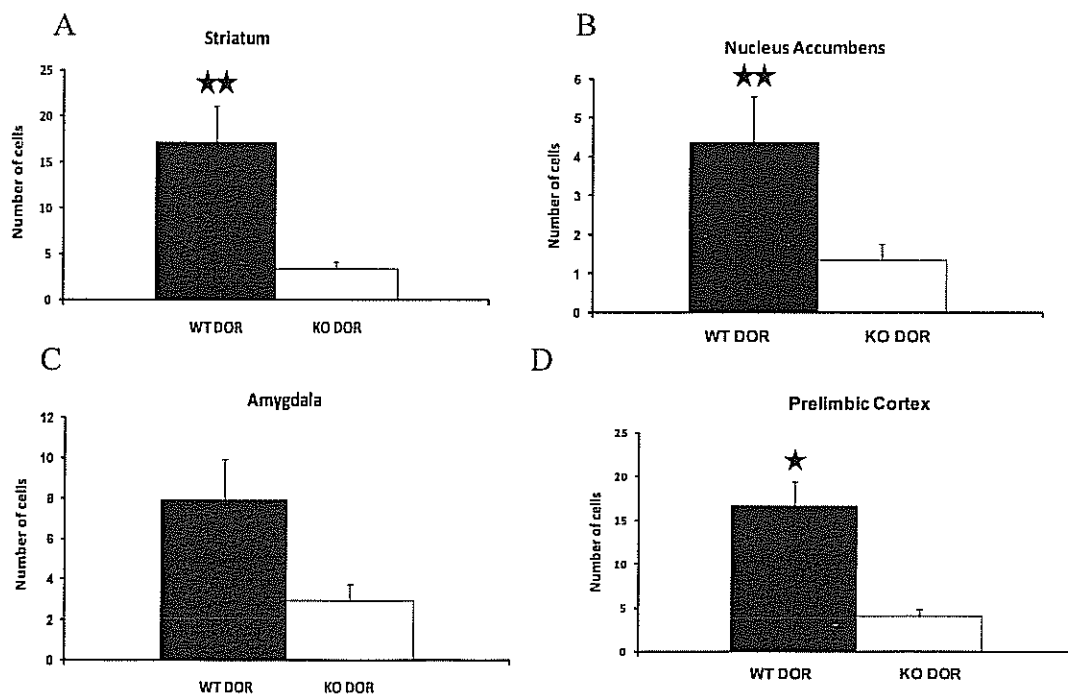


Figura 7: Recaída a la búsqueda de cocaína en ratones control (WT DOR) y en ratones knockout deficientes para el receptor opioide delta (KO DOR). Representación del promedio de los 3 días del entrenamiento en que los animales que alcanzaron el criterio de adquisición, promedio de los 3 días que se alcanzó el criterio de extinción y la respuesta operante durante la recaída a la búsqueda de cocaína inducida por el estímulo condicionado. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=10-13). ★★ p<0.01 vs. adquisición, ★★★ p<0.001 vs. adquisición, ☆☆☆ vs. extinción, ## p<0.01 vs. KO DOR.

En resumen, el receptor opioide delta está implicado en los efectos reforzantes de la cocaína y existen diferencias significativas entre genotipos en la recaída a la búsqueda de la droga.

Tras completar la fase comportamental se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de los niveles de expresión de c-fos en cortes de los cerebros de estos animales, analizando así la activación neuronal en diversas áreas cerebrales relacionadas con los procesos de recompensa (corteza prelámbica, estriado, núcleo accumbens, amígdala e hipocampo) (figura 8 A,B,C,D,E,F,G).



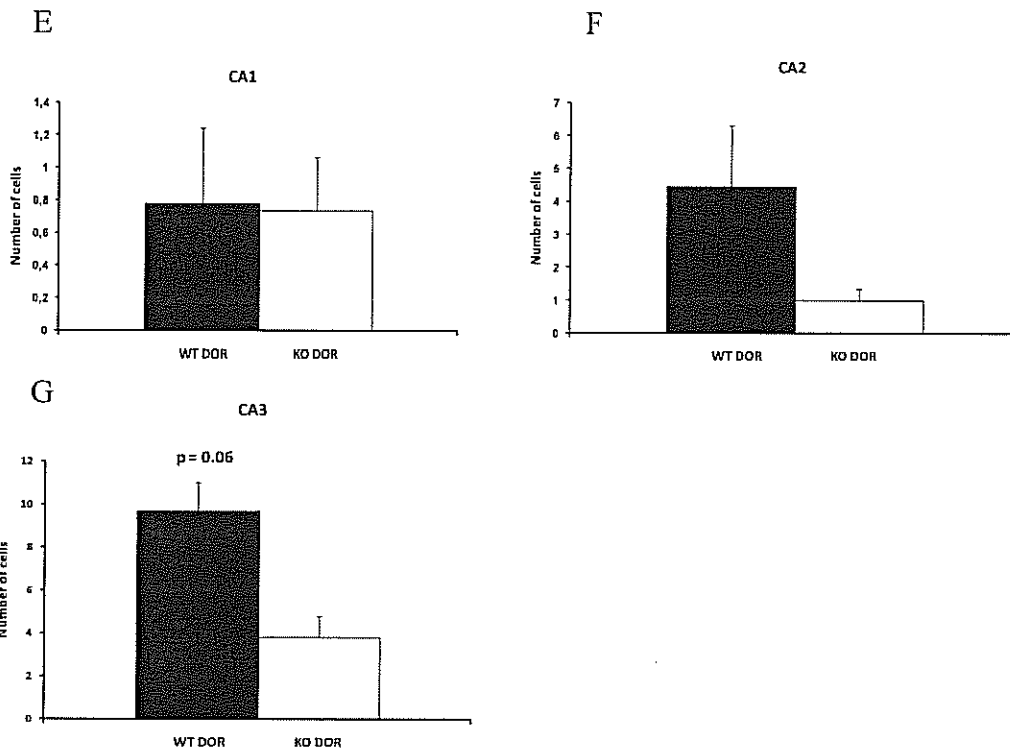


Figura 8: Niveles de expresión de c-fos en animales knockout del receptor opioide delta (KO DOR) y controles (WT DOR). (A) estriado, (B) núcleo accumbens, (C) amígdala, (D) corteza prelímbica, (E) región CA1 del hipocampo, (F) región CA2 del hipocampo, (G) región CA3 del hipocampo. Los datos están expresados en media \pm SEM ($n=3$ en WT DOR, $n=5$ en KO DOR). \star $p<0.05$ vs. WT DOR; $\star\star$ $p<0.01$ vs. KO DOR.

Nuestros resultados muestran que en las áreas cerebrales del estriado, núcleo accumbens y la corteza prelímbica, los animales KO DOR presentan una menor activación neuronal evidenciada por una menor expresión de c-fos.

Se han evaluado las propiedades adictivas de la cocaína en ratones deficientes para el precursor de la proencefalina (KO PENK). Estos ratones KO y sus controles WT fueron entrenados para autoadministrarse cocaína durante 5 días en sesiones de FR1 y 7 días en sesiones de FR3 (figura 9).

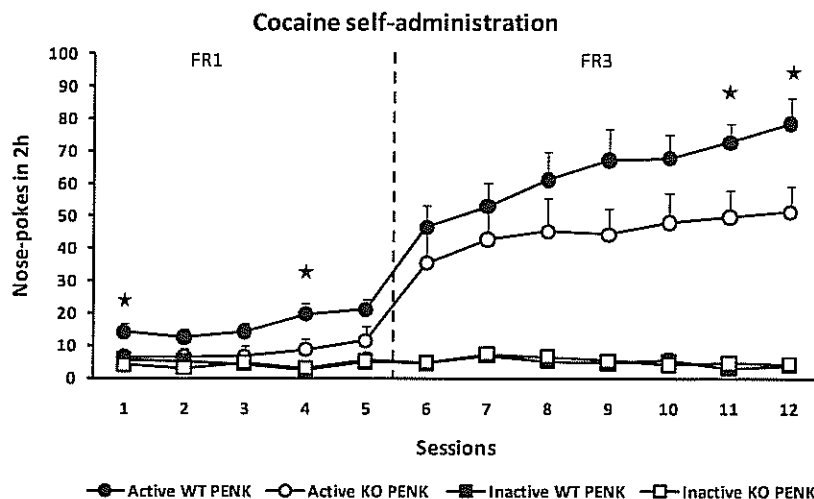


Figura 9. Adquisición del comportamiento operante mantenido por cocaína en ratones knockout constitutivos del precursor pre-proencefalina (KO PENK) y de los correspondientes animales wild-type (WT PENK). Número de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 2 h con

la dosis de 0.5 mg/kg/infusión durante 12 días. Los 5 primeros días corresponden a un entrenamiento en razón fija 1 mientras que los 7 últimos corresponden a un entrenamiento en razón fija 3. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=14 en el grupo de KO PENK y n=11 en el grupo de ratones WT PENK). * p<0.05 vs. KO PENK, ** p<0.01 vs. KO PENK.

Después del período de adquisición los animales fueron expuestos a una sesión de razón progresiva (figura 10). Nuestros resultados muestran que los ratones KO presentan una menor motivación por la cocaína en comparación a los ratones controles WT.

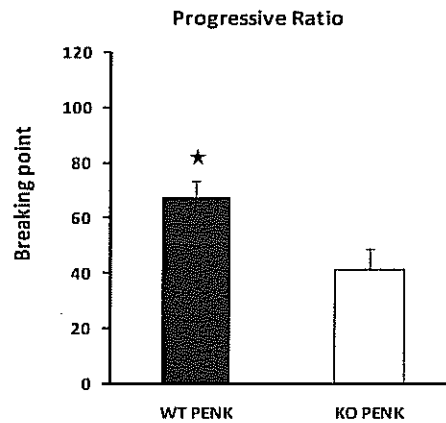


Figura 10: Condicionamiento operante mantenido por cocaína en razón progresiva. Razón alcanzada en la sesión bajo razón progresiva durante 3 h por los ratones WT y KO del precursor pre-proencefalina. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=14 en el grupo de KO PENK y n=14 en el grupo de ratones WT PENK). * p<0.05 vs. KO PENK.

Los ratones que alcanzaron los criterios de adquisición (100% de animales WT PENK y el 73% de animales KO PENK) fueron sometidos a un período de **extinción** hasta que reducen el comportamiento operante a un 30% de los niveles durante la adquisición (máximo 15 días). La recaída a la autoadministración de cocaína se indujo por factores ambientales asociados en ratones que mostraron extinción por exposición de los mismos a los factores ambientales previamente asociados a la administración de droga (figura 11).

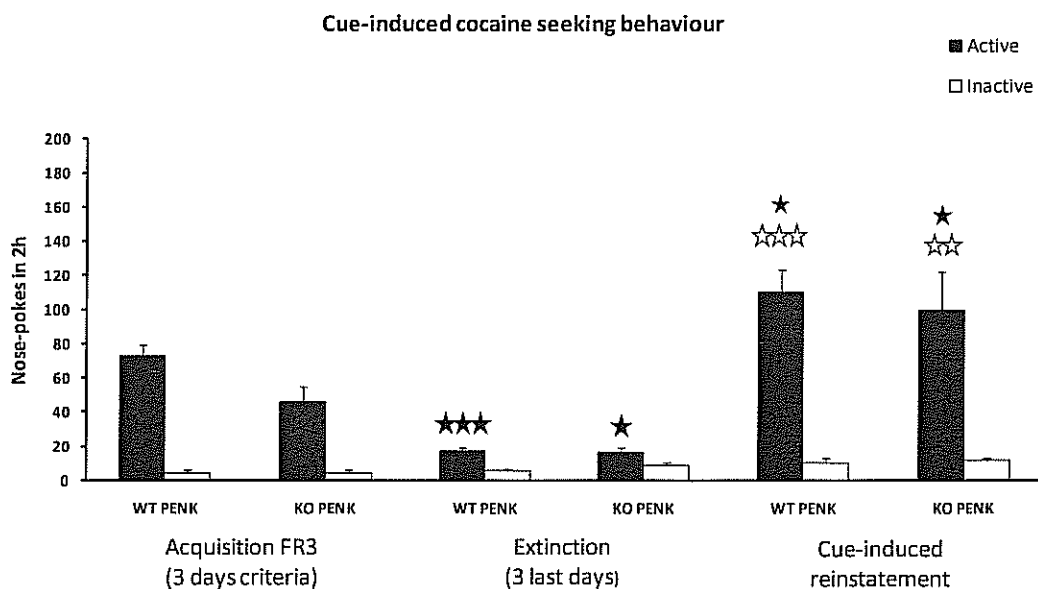


Figura 11: Recaída a la búsqueda de cocaína en ratones control (WT PENK) y en ratones knockout deficientes para el precursor pre-proencefalina (KO PENK). Representación del promedio de los 3 días del entrenamiento en que los animales alcanzaron el criterio de adquisición, del promedio de los 3 días que se alcanzó el criterio de extinción y la respuesta operante durante la recaída a la búsqueda de cocaína inducida por el estímulo condicionado. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=8-14). * p<0.05 vs. adquisición, ** p<0.01 vs. adquisición, *** p<0.001 vs. adquisición, ☆☆ p<0.01 vs. extinción, ☆☆☆ vs. extinción, ## p< 0.01 vs. KO DOR.

En resumen, el precursor pre-proencefalina está implicado en los efectos reforzantes de la cocaína y la dosis de 0.5 mg/kg/infusión es menos reforzante en los ratones mutantes. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la recaída a la búsqueda de la droga.

Objetivo 2b. Evaluar la participación de los receptores opioides mu, delta y de la pre-proencefalina en la auto-administración frustrada.

Tras la fase de entrenamiento y adquisición del condicionamiento operante mantenido por comida bajo razón fija 1, 5 y 10, los animales fueron sometidos a 10 sesiones bajo razón progresiva. En estas sesiones la secuencia de respuestas necesarias para obtener un pellet aumentará de acuerdo con la siguiente secuencia predeterminada: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-85-115-150-300. Durante estas sesiones no se observaron diferencias significativas entre los ratones WT y los KO para el receptor opioide mu. Después de estas 10 sesiones, se realizó una última sesión donde los animales que alcanzaron la razón 150 de la serie anteriormente descrita fueron divididos en tres grupos experimentales: control positivo, grupo de frustración y grupo de desesperación aprendida.

Los ratones expuestos a la administración frustrada de una recompensa, después de alcanzado un punto de respuestas de 150, perseveraron en las respuestas en la palanca activa. En el caso de los animales WT que experimentaron dicha frustración perseveraron más que sus controles no frustrados. Por otro lado, fueron los ratones KO del receptor opioide mu frustrados los que mayor número de respuestas realizaron durante los 10 min adicionales, en comparación con el resto de grupos (Figura 12).

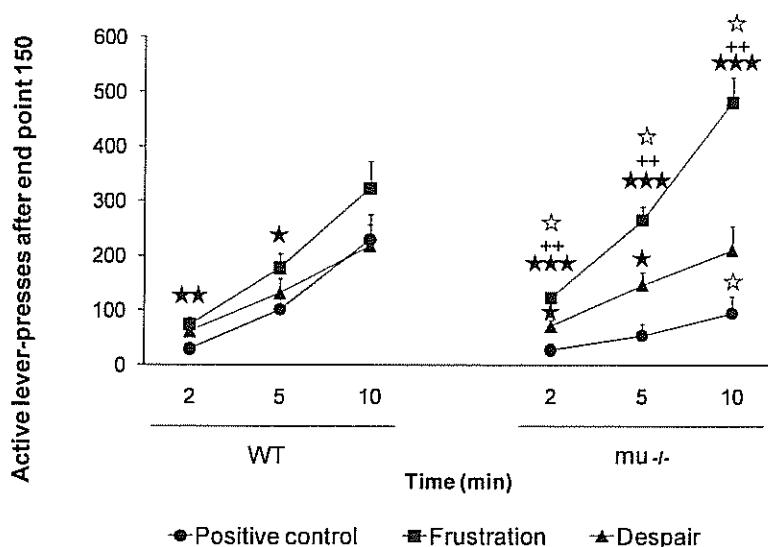


Figura 12. Manipulaciones en la palanca activa después de alcanzar la razón 150. Número de manipulaciones en la palanca activa durante 10 min adicionales posteriores a alcanzar la razón 150. Los datos se expresan como media \pm SEM (n =10 en cada grupo). $\star p < 0.05$, $\star\star p < 0.01$, $\star\star\star p < 0.001$ vs. Control positivo entre genotipo, $\star p < 0.05$ vs. WT entre grupo experimental, $++ p < 0.01$ vs. desesperado entre genotipo (one-way ANOVA).

Los resultados con el test del residente-intruso revelaron un mayor comportamiento agresivo en el grupo de frustración en WT y mu KO respecto a sus controles. Al mismo tiempo, los ratones frustrados KO del receptor mu opioide mostraron el mayor comportamiento agresivo en comparación con el resto de grupos (Figura 13).

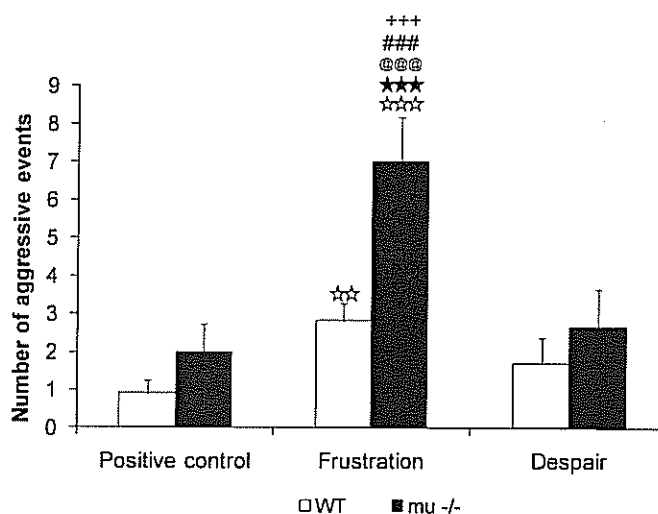


Figura 13. Test del residente intruso de ratones mu KO y WT. Número de comportamientos agresivos. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 10 en cada grupo). $\star\star p < 0.01$, $\star\star\star p < 0.001$ vs. WT control positivo, $\star\star\star p < 0.001$ vs. control positivo KO, $+++ p < 0.001$ vs. desesperado WT, $### p < 0.001$ vs. desesperado KO, $@@@ p < 0.001$ vs. frustración WT (one-way ANOVA).

El mismo procedimiento se realizó con animales WT y KO del receptor opioide delta. Después de la fase de adquisición y entrenamiento bajo razón fija 1, 5 y 10, estos animales se sometieron a 10 sesiones bajo razón progresiva. No se observaron diferencias significativas entre genotipos en cuanto a la razón alcanzada por los animales durante estas sesiones.

Tras las 10 sesiones, se realizó una sesión adicional en razón progresiva, en la cual los animales que completaron la razón 150 se dividieron en 2 grupos experimentales (control positivo y frustración). Del mismo modo que con los ratones mu KO, los animales frustrados perseveraron en la manipulación de la palanca activa más que sus controles, siendo los animales delta KO frustrados los que presentaron el mayor número de manipulaciones en la palanca activa respecto al resto de grupos durante los 10 min adicionales posteriores a la razón 150 (Figura 14).

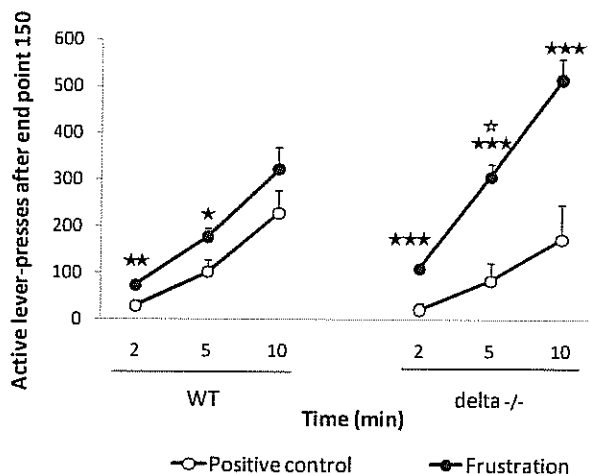


Figura 14. Manipulaciones en la palanca activa después de alcanzar la razón 150. Número de manipulaciones en la palanca activa durante 10 min adicionales posteriores a alcanzar la razón 150. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo). $\star p < 0.05$, $\star\star p < 0.01$, $\star\star\star p < 0.001$ vs. control positivo entre genotipo, $\star p < 0.05$ vs. WT entre grupo experimental (one-way ANOVA).

El test del residente intruso expuso que los animales frustrados delta KO y WT mostraron un mayor comportamiento agresivo que sus controles. No obstante, esta diferencia fue significativa solamente en el grupo frustrado WT respecto a su control (Figura 15).

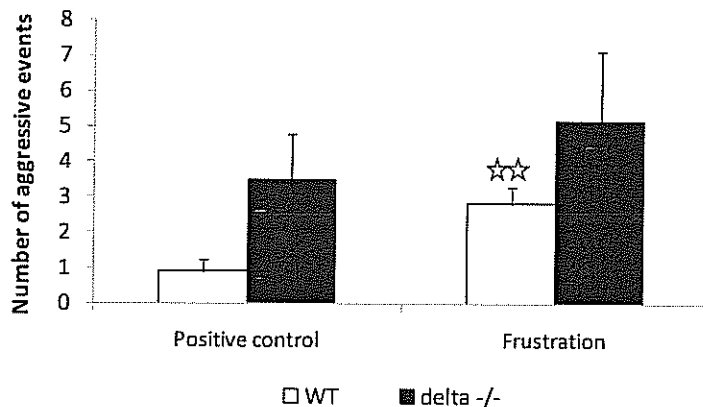


Figura 15. Test del residente intruso de ratones delta KO y WT. Número de comportamientos agresivos. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo). $\star\star p < 0.01$ vs. WT control positivo (one-way ANOVA).

Un abordaje experimental similar al descrito en el apartado anterior se ha empleado para evaluar las consecuencias de un comportamiento operante frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína en ratones KO del receptor opioide mu (KO MOR) y sus controles WT. En primer lugar, los ratones fueron entrenados en patrones de refuerzo de razón fija 1, 3 para obtener una dosis de cocaína de 0.5 mg/Kg/infusión (figura 16).

Cocaine self-administration

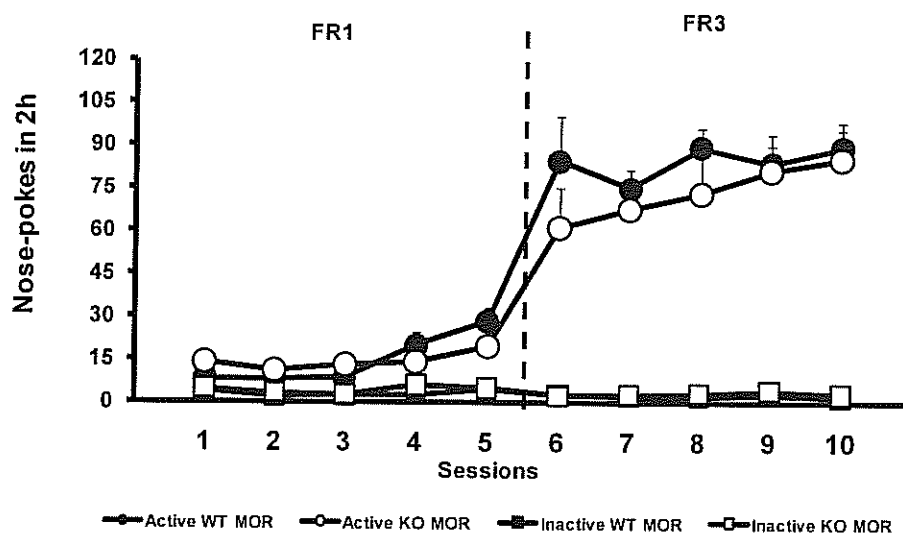


Figura 16: Adquisición del comportamiento operante mantenido por cocaína en ratones knockout constitutivos del receptor opioide mu (KO MOR) y de los correspondientes animales wild-type (WT MOR). Número de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 2 h con la dosis de 0.5 mg/kg/infusión durante 10 días. Los 5 primeros días corresponden a un entrenamiento en razón fija 1 mientras que los 5 últimos corresponden a un entrenamiento en razón fija 3. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=10 en ambos grupos).

Después de esta fase de entrenamiento los animales efectuaron 5 sesiones bajo razón progresiva. En estas sesiones la secuencia de respuestas necesarias para obtener una infusión de cocaína aumentará de acuerdo con la siguiente secuencia predeterminada: 1-2-3-5-12-18-27-40 (Figura 17).

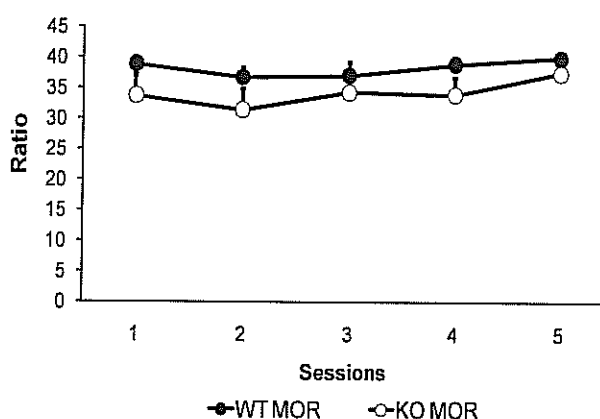


Figura 17. Condicionamiento operante mantenido por cocaína en razón progresiva. Razón alcanzada en las sesiones bajo razón progresiva durante 2 h por los ratones WT y KO del receptor opioide mu.

Tras 5 días de sesiones bajo PR se realizó una sesión adicional, donde aquellos ratones que alcanzaron un índice de respuestas de 40 en el patrón de razón progresiva se dividieron en 2 grupos experimentales: los que fueron sometidos al paradigma de frustración tras la auto-administración y sus controles positivos. Las consecuencias de este comportamiento operante de frustración se

evaluaron a nivel comportamental. Los datos muestran que los ratones expuestos a la administración frustrada de cocaína tras completar la razón 40 de la serie de razón progresiva, perseveraron en las respuestas del orificio activo sin diferencias entre genotipos (Fig. 18).

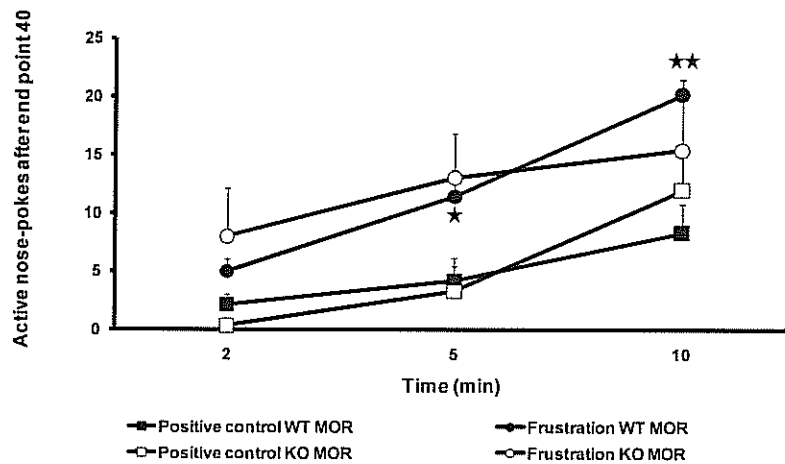
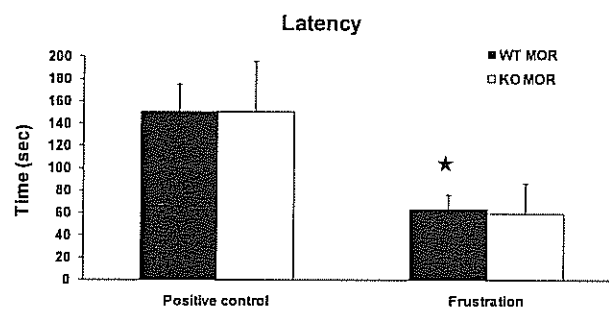


Figura 18. Manipulaciones en el orificio activo después de alcanzar la razón 40. Número de manipulaciones en el orificio activo durante 10 min adicionales posteriores a alcanzar la razón 40. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 3-6$). $\star p < 0.05$ vs. WT MOR, $\star\star p < 0.01$ vs. WT MOR.

Son destacables los resultados con el test del residente intruso, que muestran una tendencia más agresiva en el grupo de frustración comparado con el grupo control. Además, esta tendencia es más estable en los animales frustrados mu KO (figura 19).

A



B

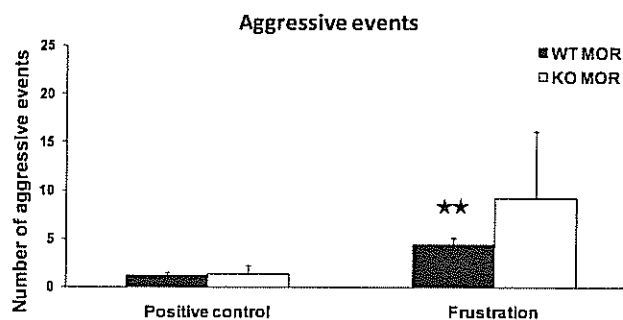


Figura 19. Test del residente intruso de ratones mu KO y WT. (A) Latencia del primer evento agresivo (B) Número de comportamientos agresivos. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 3-6$). $\star p < 0.05$ vs. WT MOR, $\star\star p < 0.01$ vs. WT MOR.

Un abordaje experimental similar al descrito en el apartado anterior se ha empleado para evaluar las consecuencias de un comportamiento operante frustrado de búsqueda compulsiva de cocaína en ratones KO del receptor opioide delta (KO DOR) y sus controles WT. En primer lugar, los ratones fueron entrenados en patrones de refuerzo de razón fija 1, 3 para obtener una dosis de cocaína de 0.5 mg/Kg/infusión (figura 20).

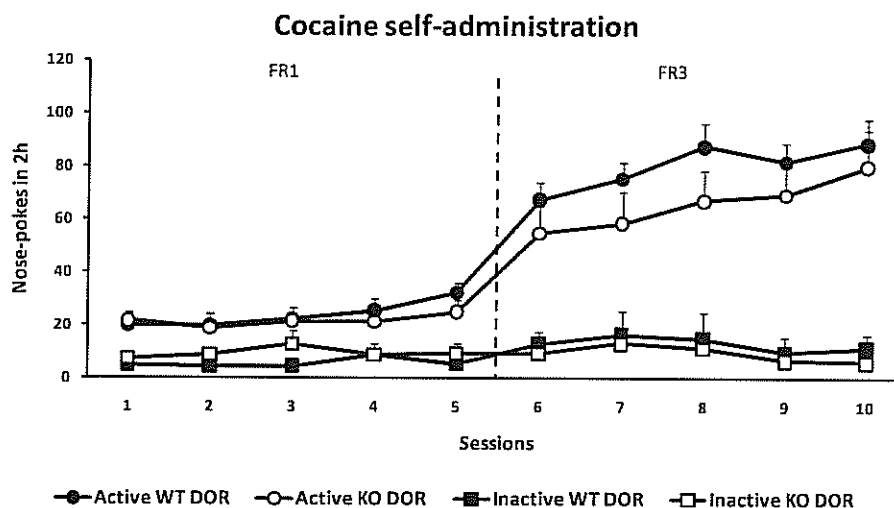


Figura 20: Adquisición del comportamiento operante mantenido por cocaína en ratones knockout constitutivos del receptor opioide delta (KO DOR) y de los correspondientes animales wild-type (WT DOR). Número de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 2 h con la dosis de 0.5 mg/kg/infusión durante 10 días. Los 5 primeros días corresponden a un entrenamiento en razón fija 1 mientras que los 5 últimos corresponden a un entrenamiento en razón fija 3. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=6 en el grupo de KO DOR y n=8 en el grupo de ratones WT DOR).

Después de esta fase de entrenamiento los animales efectuaron 5 sesiones bajo razón progresiva. En estas sesiones la secuencia de respuestas necesarias para obtener una infusión de cocaína aumentará de acuerdo con la siguiente secuencia predeterminada: 1-2-3-5-12-18-27-40 (Figura 21).

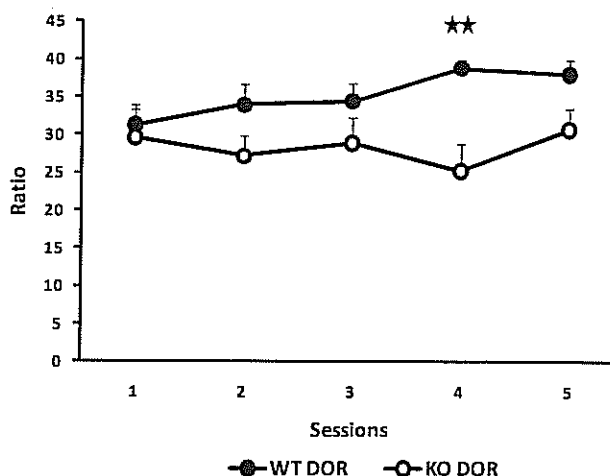


Figura 21. Condicionamiento operante mantenido por cocaína en razón progresiva. Razón alcanzada en las sesiones bajo razón progresiva durante 2 h por los ratones WT y KO del receptor opioide delta y sus controles wild-type.

Tras 5 días de sesiones en razón progresiva se realizó una sesión adicional, donde aquellos ratones que alcanzaron un índice de respuestas de 40 en el patrón de razón progresiva se dividieron en 2 grupos experimentales: los que fueron sometidos al paradigma de frustración tras la auto-administración y sus controles positivos. Las consecuencias de este comportamiento operante de frustración se evaluaron a nivel comportamental. Los datos muestran que los ratones expuestos a la administración frustrada de cocaína tras completar la razón 40 de la serie de razón progresiva, perseveraron en las respuestas del orificio activo sin diferencias entre genotipo (figura 22).

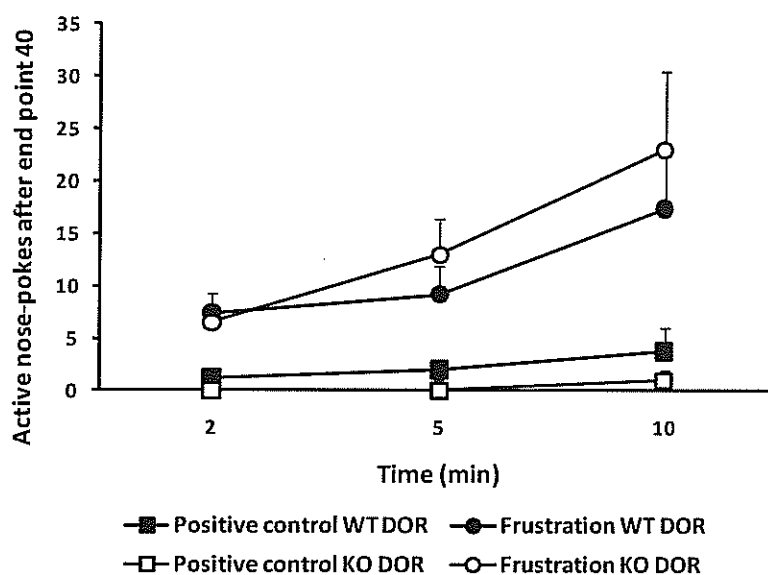
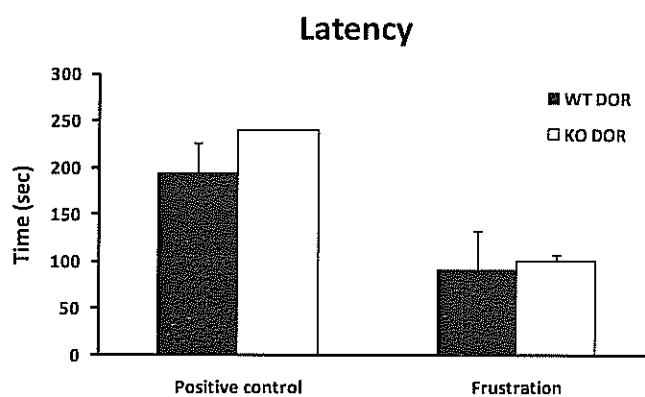


Figura 22. Manipulaciones en el orificio activo después de alcanzar la razón 40. Número de manipulaciones en el orificio activo durante 10 min adicionales posteriores a alcanzar la razón 40. Los datos se expresan como media \pm SEM (n =2-5).

Son destacables, además, los resultados que se obtuvieron con el test del residente-intruso, que mostraron una tendencia más agresiva en el grupo de frustración comparado con el grupo control (figura 23).

A



B

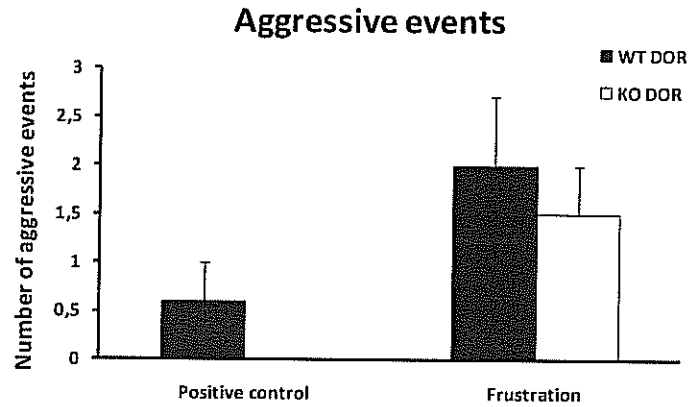


Figura 23. Test del residente intruso de ratones mu KO y WT. (A) Latencia del primer evento agresivo (B) Número de comportamientos agresivos. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 2-5).

Nuestros resultados demuestran que la administración frustrada del reforzante, en este caso comida y/o cocaína, provoca cambios comportamentales en los ratones sometidos a dicha frustración, que se manifiestan en un incremento de la respuesta operante tras la frustración y un incremento de la agresividad. Al mismo tiempo, nuestros resultados también demuestran el papel específico de los receptores opioides mu y delta en dicha frustración provocada por la ausencia de refuerzo.

Objetivo 2c. Investigar la participación de poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en la recaída a un comportamiento de búsqueda de droga mediante el empleo de ratones knockout condicionales (subproyecto 1, objetivo 2c).

El objetivo fue estudiar la participación de poblaciones específicas de receptores mu opioides límbicos en la recaída a la búsqueda de la droga, después de un periodo de abstinencia. Para ello se utilizaron ratones knockout condicionales, denominados ratones mu GABA $-/-$, que no expresan el receptor μ opioide en neuronas gabaérgicas principalmente localizadas en el sistema límbico. En base a la literatura, se asumió que un modelo animal de autoadministración intravenosa de heroína sería más adecuado que la autoadministración de otras drogas de abuso por ser el receptor mu opioide el principal target de esta droga. Se llevaron a cabo las tres series experimentales que se detallan a continuación.

Experimento 1: curva dosis respuesta y recaída inducida por el estímulo condicionado

Como primer objetivo, se realizó una curva dosis respuesta de heroína. Se utilizó un diseño intra-sujetos en el que las dosis de heroína se iban presentando en orden decreciente y después de que los animales presentasen como mínimo 2 días de estabilidad en el número de inyecciones recibidas. El programa de refuerzo utilizado fue el de razón fija 1 (cada respuesta del ratón es reforzada por una inyección de heroína) y la duración de las sesiones fue de una hora por día. Las dosis de heroína

utilizadas fueron las siguientes: 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 y 0.006 mg/kg/infusión de 23 μ l. Después de 21 días de autoadministración intravenosa de heroína con diferentes dosis se realizó una sesión de tres horas para evaluar la motivación por la búsqueda de heroína con el programa operante de razón progresiva. En este programa la secuencia de respuestas necesarias para obtener una inyección intravenosa de la droga aumenta de acuerdo con la siguiente secuencia predeterminada: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-85-115-150-300. Después de la sesión de razón progresiva se sometió a los animales a un período de extinción de 13 sesiones de 1 hora al día en las cuáles los animales no tenían acceso a la droga y se esperaba que la respuesta operante se redujera hasta valores inferiores al 30 % de los niveles previos de respuesta obtenidos cuando el acceso a la droga estaba presente. Después de este periodo de extinción se sometió a los animales a una prueba de recaída inducida por la presentación del estímulo condicionado asociado a la obtención de la droga y contingente a la respuesta del animal. Dicho estímulo condicionado consistía en la presentación de una luz situada encima del agujero activo que se encendía cada vez que el animal emitía una respuesta operante para obtener la droga. Se considera que los estímulos asociados al consumo de drogas son capaces de inducir recaída de la búsqueda compulsiva de la droga. Para más detalles sobre el protocolo, ver figura 24.

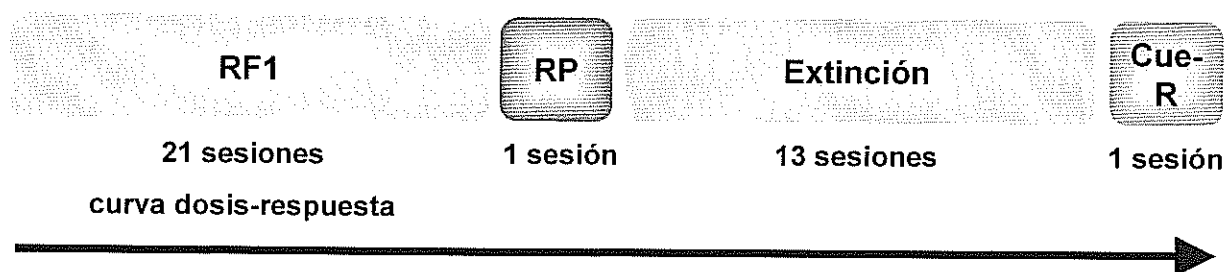


Figura 24. Protocolo experimental del experimento 1. Las dosis de heroína utilizadas fueron las siguientes: 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.006 mg / Kg / infusión. Las sesiones fueron de 1 hora por día, el time-out después de cada inyección fue de 10 segundos. Cue: estímulo condicionado, luz encima del agujero activo asociada a la a la presentación de la droga y presentado después de la respuesta del animal. Cue-R: día del test de recaída inducida por la luz asociada a la droga. FR: Razón fija, PR: razón progresiva (3 horas).

Los resultados obtenidos en la adquisición del comportamiento operante mantenido por heroína muestran que los ratones knockout condicionales **mu GABA -/-** presentan mayor número de inyecciones que los ratones WT, de forma significativa, durante los primeros días de adquisición del comportamiento operante con la dosis de 0.1 mg/kg/infusión. Durante los 21 días de condicionamiento operante, los ratones **mu GABA -/-** presentan mejor discriminación entre el agujero activo e inactivo que los ratones WT. También presentan una tendencia a incrementar el número de infusiones a medida que las dosis de heroína van decreciendo. Los animales WT empiezan a presentar discriminación entre los agujeros activo e inactivo en las dosis más bajas de 0.0125 y 0.006 mg/kg/infusión (Figura 25).

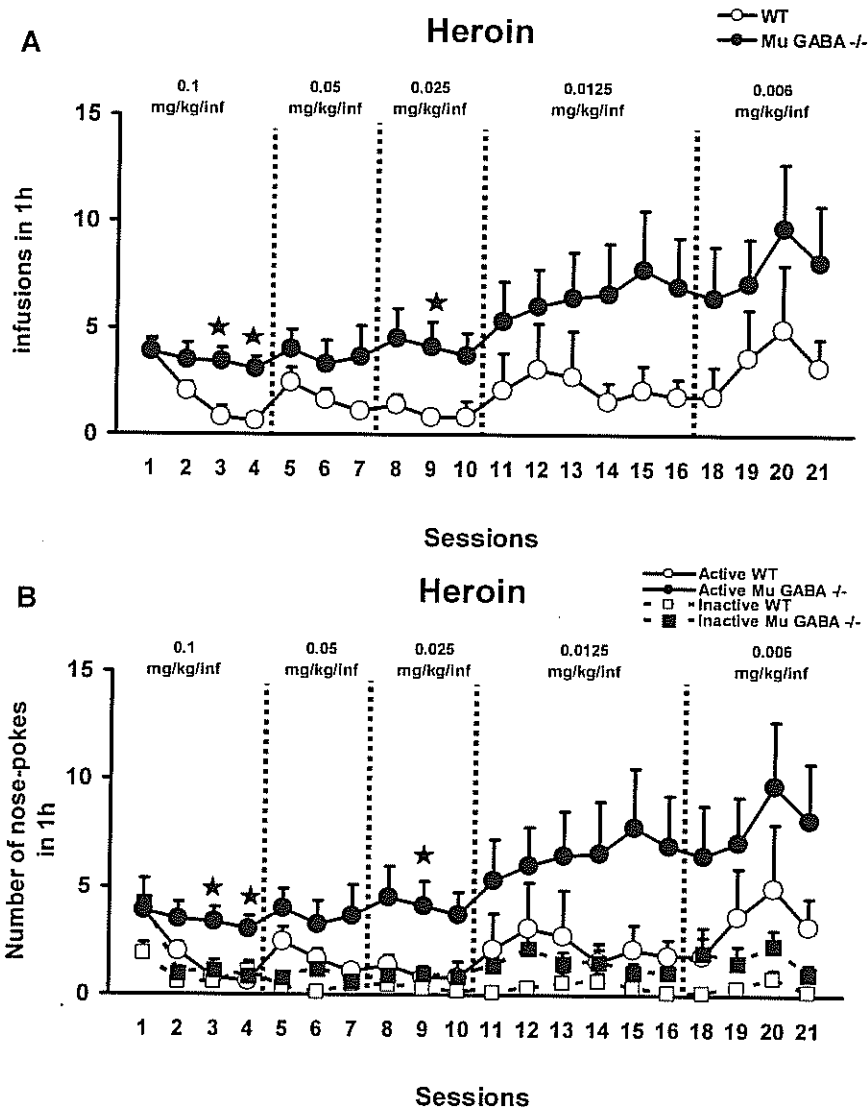


Figura 25. Curva de adquisición de la respuesta operante mantenida por diferentes dosis de heroína de ratones knockout condicionales del receptor opiode mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA -/-) y de los correspondientes animales wild-type (WT). (A) Número de infusiones y (B) de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 1 h con las diferentes dosis de heroína durante 21 días en razón fija 1. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=11 en el grupo WT y n=18 en el grupo de ratones Mu GABA -/-). * $p < 0.05$ vs. Mu GABA -/-.

La curva dosis-respuesta presenta un aplanamiento en los animales WT en comparación con los ratones mu GABA -/-, los cuales presentan niveles más altos de respuesta en todas las dosis testadas siendo las diferencias significativas en la dosis más alta de 0.1 y en la dosis intermedia de 0.025 mg/kg/infusión. Ambos genotipos presentan niveles de respuesta más elevados con dosis menores de la droga (Figura 26).

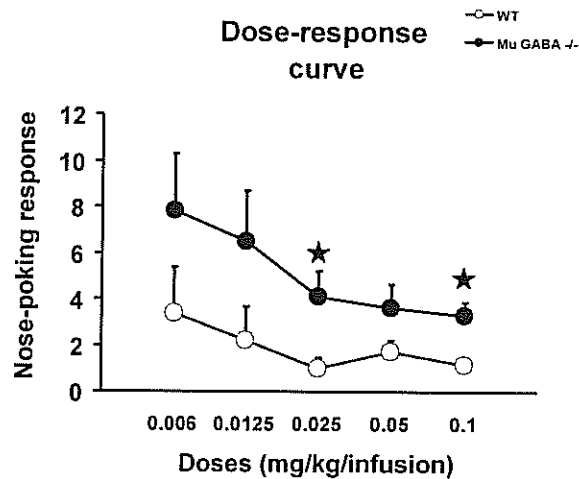


Figura 26. Curva dosis respuesta de heroína de ratones knockout condicionales del receptor opioide mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA^{-/-}) y de los correspondientes animales wild-type (WT). Número de respuestas en el agujero activo para obtener la droga en sesiones de 1 h con las diferentes dosis de heroína en razón fija 1. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=11 en el grupo WT y n=18 en el grupo de ratones Mu GABA^{-/-}). \star p<0.05 vs. Mu GABA^{-/-}.

La motivación por la búsqueda de heroína con la dosis de 0.0125 mg/kg/infusión también es mayor en los ratones mu GABA^{-/-} que en los WT. El trabajo que están dispuestos a realizar por la obtención de un único reforzador es más elevado en los animales que no expresan el receptor mu en neuronas gabaérgicas del sistema límbico (Figura 27).

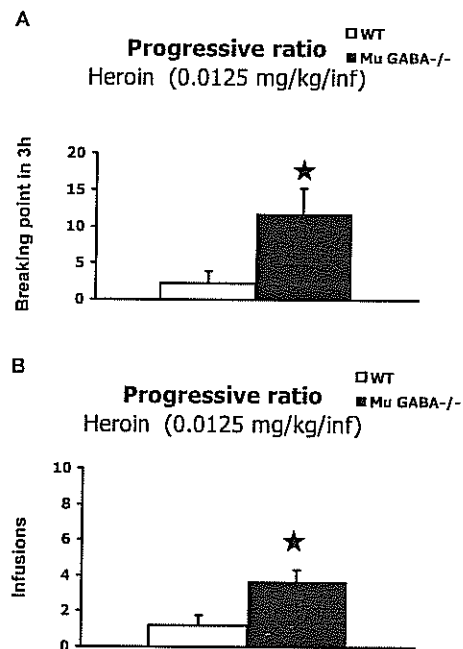


Figura 27. Motivación por la búsqueda de heroína en el programa de razón progresiva. (A) Punto de ruptura o razón máxima alcanzada en la sesión bajo razón progresiva y (B) infusiones obtenidas durante 3 h por los ratones WT y Mu GABA^{-/-}. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=11 en el grupo WT y n=18 en el grupo de ratones Mu GABA^{-/-}). \star p<0.05 vs. Mu GABA^{-/-}.

Después de evaluar los animales en la prueba de motivación por la heroína, entran en una fase de extinción. Una vez finalizada esta extinción, se evaluó en los animales la recaída inducida por un estímulo condicionado, la luz asociada a la droga. Los ratones mu GABA^{-/-} presentaron mayor

número de respuestas en el agujero activo que durante la fase de extinción y que los ratones WT durante el test de recaída inducida por la luz. Por el contrario los animales WT presentaron el mismo nivel de respuestas durante el test de recaída que durante la fase de extinción (Figura 28).

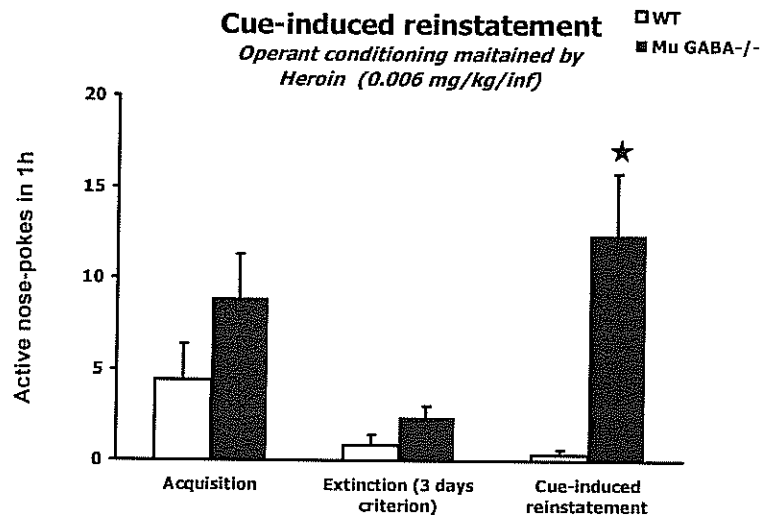


Figura 28. Respuesta operante mantenida por heroína en ratones WT y en ratones knockout knockout condicionales del receptor opioide mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA ^{-/-}). Representación del promedio de los 3 días del entrenamiento en que los animales alcanzaron el criterio de adquisición, del promedio de los 3 días que se alcanzó el criterio de extinción y la respuesta operante durante la recaída de la búsqueda de heroína inducida por el estímulo condicionado denominado cue. Los datos están expresados en media ± SEM (n=11 en el grupo WT y n=18 en el grupo de ratones Mu GABA ^{-/-}). * p<0.05 vs. Mu GABA ^{-/-}.

Experimento 2: Adquisición del comportamiento operante mantenido por la heroína (0.006 mg/kg/infusión) y recaída inducida por el estímulo condicionado

Teniendo en cuenta que en el experimento 1 la única dosis de heroína donde los ratones WT discriminaban entre los dos orificios y presentaban un número de respuestas más elevado era la dosis menor de 0.006 mg/kg/infusión, se utilizó esta dosis para el estudio de la recaída a la búsqueda de la droga. Igual que en el experimento anterior, el programa de refuerzo utilizado fue el de razón fija 1 (cada respuesta del ratón es reforzada por una inyección de heroína) y la duración de las sesiones fue de una hora por día. Después de 10 días de autoadministración intravenosa de heroína se realizó una sesión de razón progresiva seguida de una fase de extinción y de un test de recaída (Figura 29).

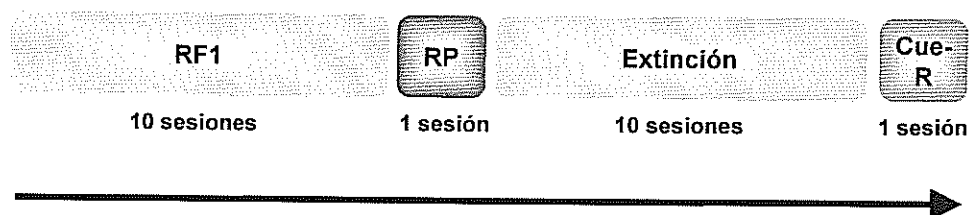


Figura 29. Protocolo experimental del experimento 2. La dosis de heroína utilizada fue de 0.006 mg/kg/infusión. Las sesiones fueron de 1 hora por día, el time-out después de cada inyección fue de 10 segundos. Cue: estímulo condicionado, luz encima del agujero activo asociada a la a la presentación de la droga después de la respuesta del animal. Cue-R: día del test de recaída inducida por la luz asociada al agujero activo. FR: Razón fija, PR: razón progresiva (3 horas).

La adquisición del comportamiento operante mantenido por heroína con la dosis de 0.006 mg/kg/infusión fue similar en los dos genotipos. Los ratones knockout condicionales Mu GABA $-/-$ presentan estadísticamente el mismo número de inyecciones que los ratones WT, excepto el primer día donde se puede ver una ligera tendencia a presentar mayor número de inyecciones. Los niveles de discriminación y estabilidad de la respuesta operante son similares en los dos genotipos, la discriminación entre los dos agujeros aparece el primer día en los knockout mientras que en los WT aparece el segundo día (Figura 30).

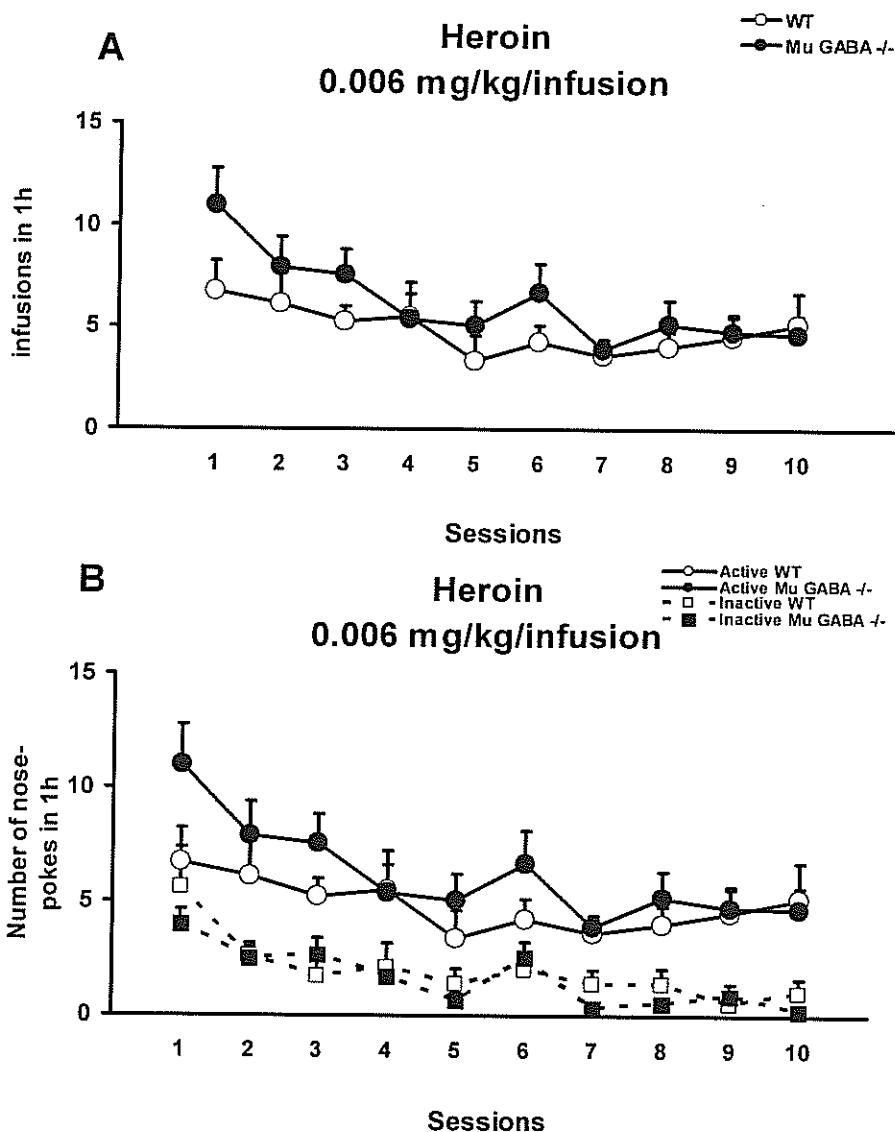


Figura 30. Curva de adquisición de la respuesta operante mantenida heroína (0.006 mg/kg/infusión) de ratones knockout condicionales del receptor opioide mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA $-/-$) y de los correspondientes animales wild-type (WT). (A) Número de infusiones y (B) de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 1 h durante 10 días en razón fija 1. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=8 en el grupo WT y n=12 en el grupo de ratones Mu GABA $-/-$).

La motivación por la búsqueda de heroína con la dosis de 0.006 mg/kg/infusión también es mayor en los ratones mu GABA $-/-$ que en los WT aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. Los ratones mutantes alcanzan un punto de ruptura más elevado que en los WT (Figura 31).

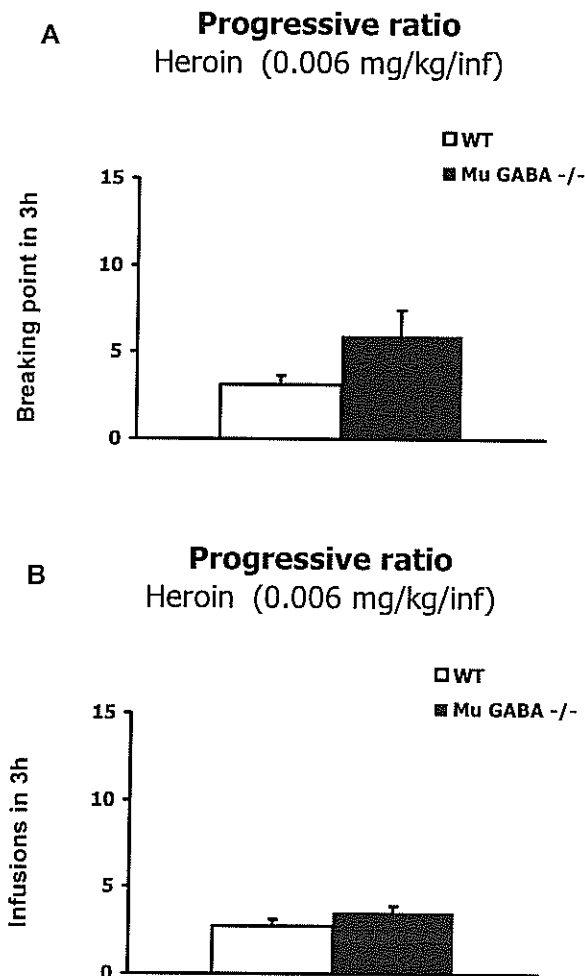


Figura 31. Motivación por la búsqueda de heroína en el programa de razón progresiva. (A) Punto de ruptura o razón máxima alcanzada en la sesión bajo razón progresiva y (B) infusiones obtenidas durante 3 h por los ratones WT y Mu GABA $-/-$. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=8 en el grupo WT y n=12 en el grupo de ratones Mu GABA $-/-$).

Al finalizar la fase de extinción, se evaluó a los animales en la prueba de recaída inducida por un estímulo condicionado, la luz asociada a la droga. Al igual que en las fases anteriores de adquisición y extinción, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos. Tanto los ratones mu GABA $-/-$ como los WT presentaron mayor número de respuestas en el agujero activo durante la recaída que durante la fase de extinción (Figura 32).

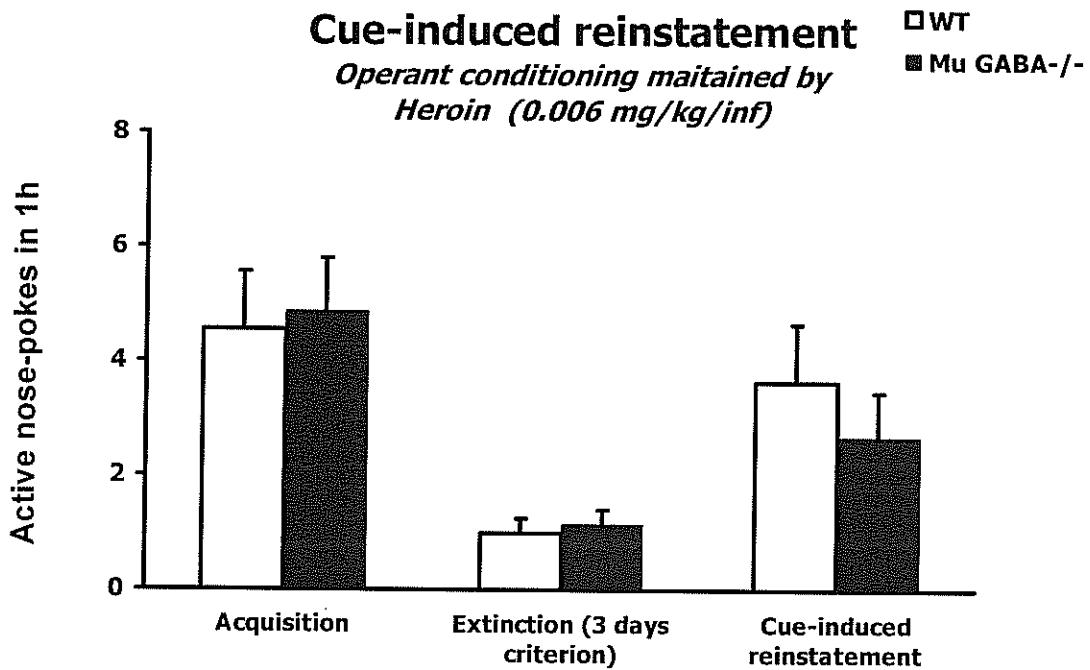


Figura 32. Respuesta operante mantenida por heroína en ratones WT y en ratones knockout knockout condicionales del receptor opioide mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA^{-/-}). Representación del promedio de los 3 días del entrenamiento en que los animales alcanzaron el criterio de adquisición, del promedio de los 3 días que se alcanzó el criterio de extinción y la respuesta operante durante la recaída de la búsqueda de heroína inducida por el estímulo condicionado denominado cue. Los datos están expresados en media ± SEM (n=8 en el grupo WT y n=12 en el grupo de ratones Mu GABA^{-/-}).

Experimento 3: Adquisición del comportamiento operante mantenido chocolate

El estudio de la adquisición del comportamiento operante mantenido por chocolate se realizó con el objetivo de estudiar la participación de los receptores mu opiodes localizados en neuronas gabaérgicas en los efectos reforzantes de una sustancia natural como el chocolate. También se diseñó con el objetivo de tener un control de los experimentos 1 y 2 realizados con heroína y poder comprobar si el fenotipo de los animales mutantes era o no específico de la heroína.

Los resultados obtenidos en la adquisición del comportamiento operante mantenido por chocolate muestran niveles similares de adquisición y de respuesta operante en ambos genotipos. Es interesante destacar que los ratones Mu GABA^{-/-} presentan mayor número de respuestas en el agujero activo, sobre todo durante el periodo de 10 segundos de time-out cuando el reforzador no es accesible, y necesitan más del doble de respuestas necesarias para obtener 100 pellets en el programa de razón fija 1 (Figura 33).

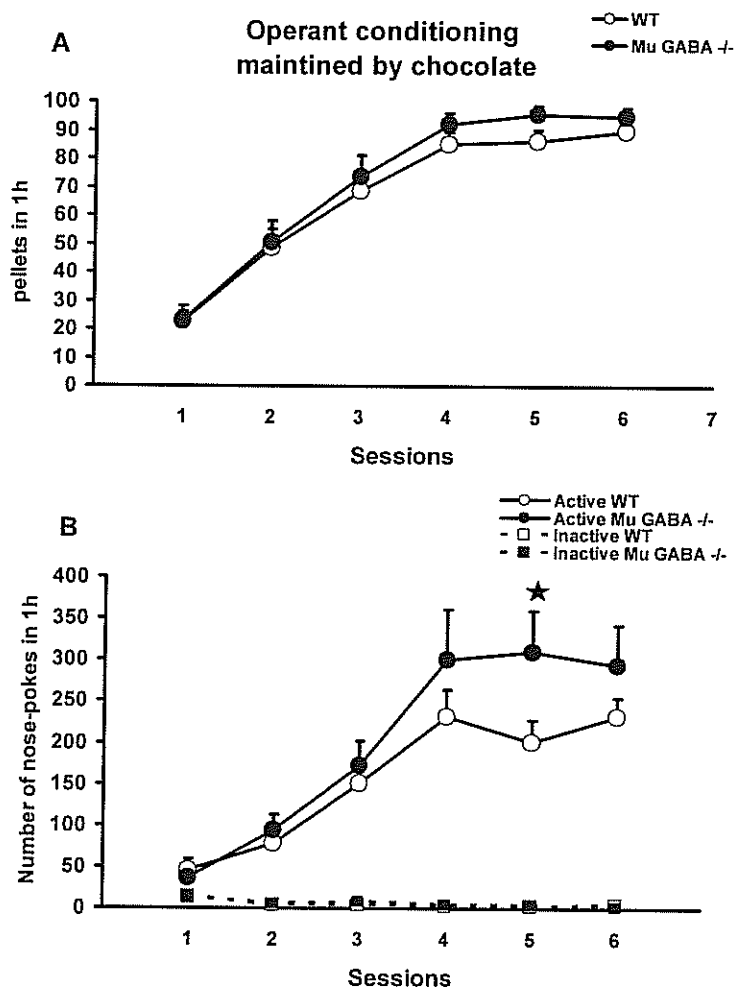


Figura 33. Curva de adquisición de la respuesta operante mantenida por chocolate de ratones knockout condicionales del receptor opioide mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA^{-/-}) y de los correspondientes animales wild-type (WT). (A) Número de pellets obtenidos y (B) de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 1 h durante 6 días en razón fija 1. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=20 en el grupo WT y n=13 en el grupo de ratones Mu GABA^{-/-}). * $p < 0.05$ vs. Mu GABA^{-/-}.

Objetivo 2d. Investigar la participación de poblaciones específicas de péptidos y receptores opioides límbicos en las respuestas comportamentales y bioquímicas producidas por un comportamiento frustrado de búsqueda compulsiva de droga mediante el empleo de ratones knockout condicionales (subproyecto 1, objetivo 2d).

Este objetivo se alcanzó con el estudio detallado de la fase de extinción del experimento 1 del objetivo 2c. Después de evaluar a los animales en sesiones de razón fija y de razón progresiva de búsqueda de heroína, estos entraron en una fase de extinción de la conducta de búsqueda de la droga, donde aprenden que su conducta no tiene como consecuencia la obtención de la misma. El primer día de extinción los ratones knockout condicionales muestran un incremento del número de respuestas para la obtención de la droga en comparación con el grupo control. Este incremento de la respuesta en ausencia de la droga corresponde a un estado de frustración producido por la ausencia del reforzador. A medida que pasan los días la respuesta de los animales va bajando

progresivamente hasta que llega al mismo nivel que la respuesta en el orificio inactivo. Se pierde la discriminación entre los agujeros activo e inactivo y se reduce la respuesta de búsqueda de la droga hasta niveles inferiores al 30% de la respuesta que se presentaba en la fase de adquisición. Los animales WT no presentan este incremento de la respuesta el primer día que se retira la droga y mantienen un nivel de respuesta bajo durante toda la fase de extinción de la respuesta operante (Figura 34).

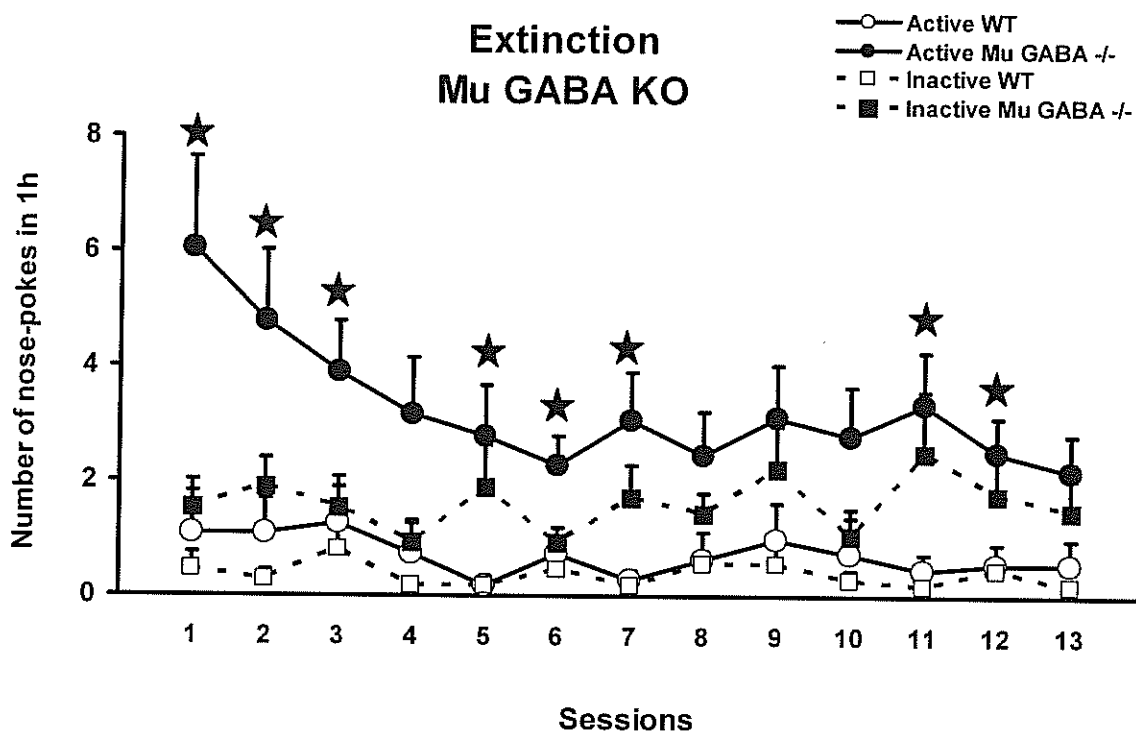


Figura 34. Curva de extinción de la respuesta operante mantenida heroína de ratones knockout condicionales del receptor opioide mu en neuronas gabaérgicas (Mu GABA -/-) y de los correspondientes animales wild-type (WT). Número de nose-pokes en el agujero activo e inactivo en sesiones de 1 h durante 13 días en razón fija 1. Los datos están expresados en media \pm SEM (n=11 en el grupo WT y n=18 en el grupo de ratones Mu GABA -/-). * $p < 0.05$ vs. Mu GABA -/-.

Estos resultados reflejan un cambio de conducta que aparece en ausencia de los receptores opioideos mu en neuronas gabaérgicas cuando los animales son expuestos a una frustración al no conseguir la droga tras la realización de la conducta operante.

OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O PENDIENTES DE RESOLUCIÓN: importe, procedencia y aplicación

No aplicable.

SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS: organismo, convocatoria y cantidad.

No aplicable.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

No aplicable.

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección pndinvestigacion@msps.es la presente memoria.

En Barcelona, a 20 de Diciembre de 2012

FIRMA



Rafael MALDONADO

Investigador Principal