



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL

Número Expediente:

Investigador Principal:

Dr. Eduardo Weruaga Prieto.

Otros Investigadores:

Dr. José Ramón Alonso Peña.

Dra. Carmela Gómez Rodríguez.

Dr. Fernando Calvo Baltanás

Azucena Rodrigo Murias. Dra. en Biología. Ayudante LOU.

David Díaz López. Dr. en Biología. Becario de Investigación del MEC.

Título Proyecto o subproyecto

Depresión y adicción a nicotina: interacción entre los sistemas nitrérgico y serotoninérgico. Orden SCO/1970/2008 de 23 junio.

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Organismo: Universidad de Salamanca.

Centro: Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

Departamento: Biología Celular y Patología.

Comunidad Autónoma: Castilla y León.

Duración: 3 años

Fecha de inicio: Noviembre de 2008

Fecha de finalización: Noviembre de 2011

Año Convocatoria: 2008

Área Temática:

1. Proyectos de investigación sobre comorbilidad psiquiátrica y determinantes neuropsicológicos en pacientes drogodependientes.

5. Investigaciones sobre aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos diferenciales entre hombres y mujeres en relación con las adicciones.

Palabras Clave: Tabaquismo, neurotransmisión, depresión.



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

Objetivo del estudio

Este proyecto se gestó para analizar la adicción a la nicotina y ver sus efectos en la producción del óxido nítrico y serotonina en el sistema nervioso central, utilizando animales de experimentación. Para ello valoramos dos tipos generales de variables: la producción de óxido nítrico y de serotonina en regiones encefálicas cognitivas y en zonas relacionadas con la adicción, tanto en ratones machos como en hembras sometidos a un tratamiento crónico con nicotina como después de un periodo de abstinencia a la droga. Además, mediante el empleo del ratón *knock-out* para la isoforma neuronal de la sintasa del óxido nítrico, comprobaremos su influencia sobre el sistema serotoninérgico en dichas zonas cerebrales.

El proyecto pretende sentar bases neurobiológicas de los efectos de la nicotina en el cerebro por medio del óxido nítrico y la serotonina y la implicación del sexo en dichos procesos, con vistas a una actuación farmacológica más adecuada encaminada a aumentar el éxito de la deshabituación tabáquica.

Material y Métodos (sujetos de estudio e instrumentalización)

Animales experimentales

Ratones adultos (2 meses) de ambos sexos estabulados en condiciones estándar en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Todos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según lo establecido en la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/ECC, directiva 2003/65/CE) y la legislación española (RD 1201/2005, ley 32/2007) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Las estirpes de ratón empleadas son:

Genotipo silvestre: C57BL/6J homocigotos sin la mutación.

Knock-out para la NOS 1: B6;129S4-Nos1^{tm1Plh} (#002633 de los Laboratorios Jackson, EEUU), homocigotos para la mutación Nos1^{tm1Plh/tm1Plh}.

Genotipado de los animales

Puesto que los ratones *knock-out* para la NOS1 (KO) no tienen un fenotipo aparente, se procedió a su genotipado para determinar los homocigotos silvestres (controles), heterocigotos (cría) y homocigotos para la mutación (verdaderos KO). Para ello se tomó una muestra de la cola bajo anestesia local (lidocaína) en el momento del destete y tras su marcaje e identificación individual.

Oligonucleótidos para el genotipado de Nos1^{tm1Plh}:

oMR0013: 5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3' oMR0014: 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'

oMR0406: 5'-TCA GAT CTG ATC CGA GGA GG-3' oMR0407: 5'-TTC CAG AGC GCT GTC ATA GC-3'

Tratamiento con drogas

Animal experimental: implantación de mini-bombas osmóticas Alzet mod.2002 (Alza Corp.) colocadas subcutáneamente (Fig. 1). Las mini-bombas se rellenaron de (-)-nicotina hidrógeno tartrato (Sigma N-5260) disuelto en solución salina isotónica (s. salina, 0.9% NaCl); pH 7.0. La dosis (24 mg·kg⁻¹·día⁻¹) se calculó como la base, y la velocidad de transfusión fue de 0,53 µl/hora. La implantación

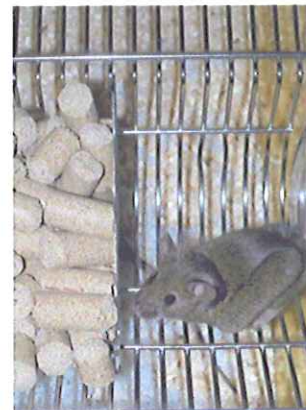


Figura 1: Ratón tras la implantación de una bomba osmótica.



de las mini-bombas se realizó bajo anestesia con isofluorano /O₂ (Forene®; 2,5-5%). En el día 14 del tratamiento se sacrificaron los animales destinados a los experimentos de adicción, mientras que a los destinados a los experimentos de abstinencia se les retiró la mini-bomba siguiendo los mismos pasos utilizados para su implantación y se sacrificaron en el día 2 posterior a su extracción.

Animal control: se realizó el mismo tratamiento que en el caso anterior, pero las mini-bombas se rellenaron con s. salina.

Test comportamental de campo abierto

Esta prueba se llevó a cabo introduciendo al ratón en el interior de una caja rectangular de plástico de con el piso dividido en 15 cuadros. Inicialmente, el animal se situó en el centro y se permitió que se movieran libremente durante 5 min. En este tiempo se contabilizaron: el número de líneas que cruza, bien con las cuatro patas (cruces completos), o bien con sólo dos de ellas (medios cruces); las veces que se alza sobre las patas traseras; el número de veces que se asea; la cantidad de defecaciones que realiza; el número de sacudidas de la cabeza; los temblores en las patas, el número de retrocesos durante el desplazamiento; las veces que se rasca; el número de veces que pone la cola vertical; y la pilo-erección.

Test comportamental del rota-rod

La prueba de rota-rod consiste en una varilla donde se sitúan los ratones y que gira con una aceleración constante que va de 4 a 40 rpm en 10 minutos. Nos permitió medir la coordinación motora de los ratones a través de dos parámetros: el tiempo de estancia en la varilla, y la velocidad de giro de la varilla en el momento de caer el ratón.

Las pruebas comportamentales/neurofisiológicas se realizaron a P0, que se utilizó como base, antes de la implantación de cualquier tratamiento, a P4 (T5), P9 (T10), P14 (T15) y P16 (T17). Sólo el último tiempo se consideraba como abstinencia (Fig. 2).

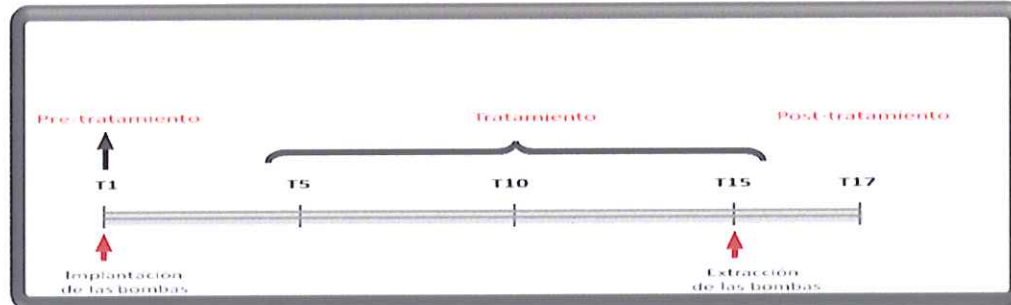


Figura 2: Línea temporal representando los momentos de implantación y extracción de las bombas osmóticas y los días de evaluación.

Inmunohistoquímica

Los animales se anestesiaron con una mezcla (3:4) de hidrocloreuro de ketamina (Ketolar) e hidrocloreuro de tiacina (Rompún; 1 µl/g peso corporal i.p.). A continuación se sacrificaron por perfusión intracardiaca con una mezcla que contenía 4% paraformaldehído y 0.2% ácido pícrico en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.3, durante 15 min. Los cerebros se diseccionaron y se cortaron en bloques que se post-fijaron en la misma mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Los bloques de tejido se crioprotegieron en sacarosa y se congelaron con ayuda de nitrógeno líquido. Mediante un frigomobil, se obtuvieron series de secciones de 30 µm en planos coronales de cada bloque.

Para el marcaje inmunohistoquímico empleamos la técnica de inmunofluorescencia. Los anticuerpos que se emplearán y sus concentraciones son las siguientes anti-NOS1 policlonal (IgG ovina, Drs. Emson y Charles, Universidad de Cambridge, UK) diluida 1:10.000; anti-serotonina (anti-5-HT; IgG de conejo, #SZ1021de Affiniti) diluida 1:3000, anti-transportador de 5-HT (IgG de conejo, Zhou *et al.*, 1996) diluida 1:10000. Los anticuerpos contra diferentes tipos de receptores de serotonina como el anti-receptor 5-HT1A (IgG de conejo, #24504 de



ImmunoStar Incorporated); el anti-receptor 5-HT_{2C} (IgG de conejo, #24505 de ImmunoStar) y el anti-receptor 5-HT₃ (IgG de conejo, #SP7002P de Acris Antibodies GmbH) no mostraron marcajes satisfactorios, por lo que no se emplearon para los análisis inmunohistológicos.

Análisis cuantitativo de las secciones procesadas histológicamente

En cada uno de los grupos experimentales y con cada una de las tinciones, se determinaron las densidades de neuronas positivas en cada una de las regiones estudiadas, así como de cantidad de marcaje positivo para las fibras que contenían serotonina (5-HT) o su transportador (5-HTT,) tomando planos focales de 0.14 μm^2 mediante un microscopio confocal (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Puesto que la gran cantidad de neuropilo positivo para 5-HTT hace imposible su análisis mediante técnicas estereológicas convencionales, para su cuantificación se analizaron los píxeles 5-HTT⁺ en dichos planos focales mediante el programa ImageJ.

En el caso del núcleo accumbens (NA) y del caudado-putamen (CP), ambos pertenecientes al estriado, hemos analizado distintas zonas de esta región encefálica lo suficientemente alejadas entre sí como para evitar solapamientos anatómicos, y que tuvieran una correspondencia funcional en respuesta a drogas de abuso.

La determinación de la densidad de neuronas inmunomarcadas se realizó mediante el análisis de dos niveles rostro-caudales comparables en cada una de las regiones de estudio (nivel rostral, N1; y nivel caudal, N2). Dado el pequeño tamaño del NA, se analizó un único plano focal en el nivel más rostral y otro en el más caudal. Este plano estaba siempre adyacente a la comisura anterior y ventrolateral a ella (Fig. 3); de esta manera nos asegurábamos de que no incluíamos otras regiones colindantes al NA, como la sustancia innominata y, especialmente las islas de Calleja, que contienen gran cantidad de neuronas productoras de NO. En el caso del CP, se analizaron 2 planos focales en el nivel más rostral: rostro-dorsal (RD) y rostro-lateral (RL); y 2 en la zona más caudal: caudo-dorsal (CD), caudo-lateral (CL; Fig. 3).

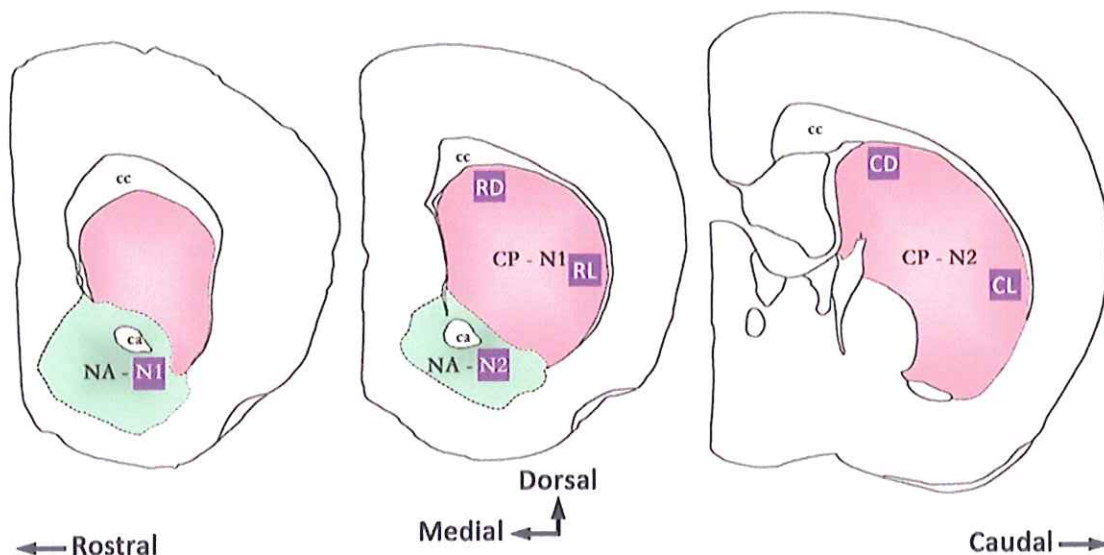


Figura 3. Localización de las zonas analizadas (cuadrados morados) en los niveles rostrales (N1) y caudales (N2) del núcleo accumbens (NA) y del caudado-putamen (CP). ca: comisura anterior; cc: cuerpo caloso; CD: zona caudo-dorsal; CL: zona caudo-lateral; RD: zona rostro-dorsal; RL: zona rostro-lateral; RM: zona rostro-medial (modificado de Hof *et al.*, 2000).



Extracción de tejido para los ensayos bioquímicos y moleculares

Los ratones se decapitaron, y los encéfalos se diseccionaron en hielo. A continuación, se realizaron lonchas de tejido (200 μm grosor) en planos coronales en un criostato y se tomaron porciones de tejido correspondientes a los caudado putamen, núcleo accumbens, área tegmental ventral, hipocampo y núcleos del rafe por medio de un bisturí quirúrgico. Las muestras se conservaron congeladas a -80°C hasta su procesamiento posterior.

Determinación de nitratos y nitritos

Las muestras de tejido se pesaron y se homogenizaron en cinco volúmenes de tampón fosfato (pH 7.5) y se centrifugaron a 2000 g durante 5 min a 4°C . El sobrenadante se incubó 2:1 con 0.3 M NaOH durante 5 min y después 3:1 con 5% ZnSO_4 para conseguir una desproteinización adecuada. La mezcla se centrifugó a 3000 g durante 20 min y los sobrenadantes se emplearon para las determinaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$. Los nitratos se redujeron a nitritos por la nitrato reductasa de *Aspergillus* (Boehringer Mannheim) en presencia de NADPH y FAD. Los nitritos totales (NO_3^- reducidos y NO_2^- pre-existentes) se evaluaron espectrofotométricamente a 546 nm, y se consideraron como los metabolitos estables del NO. Para la preparación de rectas patrón se emplearon soluciones de nitrato y nitrito sódicos. Para homogeneizar los resultados, las cantidades resultantes se refirieron al peso del tejido del cual se obtuvieron.

Análisis estadístico

En primer lugar evaluaremos la normalidad y homoscedasticidad de los resultados (*test* de Kolmogorov-Smirnov para una muestra). Dependiendo de este análisis, los resultados serán analizados mediante pruebas paramétricas (ANOVA en la comparación global intergrupos aplicando *test ad hoc* si existen diferencias globales) o no paramétricas (*test* de Kruskal-Wallis en la comparación global intergrupos aplicando el *test* de Mann-Whitney si existen diferencias globales para la comparación entre grupos particulares).

Resultados

Expresión de la NOS1 en el encéfalo del ratón

El análisis de la expresión de la NOS1 en el encéfalo de ratón silvestre muestra que ésta se localiza esencialmente en células de fenotipo neuronal. Esta inmunolocalización se produce tanto en los ratones macho y hembra control tratados con s. salina, como en los animales experimentales de ambos sexos a los que se les implantaron las mini-bombas rellenas de nicotina. Concretamente, en el estriado, dichas neuronas, tienen una morfología típica de las células productoras de NOS1 en éstas áreas cerebrales, es decir, son células con un soma poligonal o fusiforme con 2-3 dendritas principales escasamente ramificadas (Fig.4), lo que coincide con las observaciones realizadas por nuestro laboratorio previamente. Los animales *KO* no poseen ningún inmunomarcaje para la NOS1.



Figura 4: Imagen de estriado de ratón realizada con microscopía confocal. Se observa la morfología poligonal (flechas) o fusiforme (punta de flecha) de los somas de las neuronas que contienen NOS1.

Expresión de la 5-HT y el 5-HTT en el encéfalo del ratón

En el encéfalo del ratón, el marcaje 5-HT+ se visualiza en somas de los núcleos del rafe, así como en muy escasas fibras en el encéfalo, siendo más abundantes en el bulbo olfatorio principal. Este patrón de inmunolocalización de la 5-HT tiene lugar tanto en los ratones machos y hembras silvestres como *KO* de ambos sexos, independientemente del grupo experimental analizado (Fig. 5).

Al contrario de lo que ocurre con la inmunolocalización de 5-HT, el 5-HTT se visualiza en una gran cantidad de neuritas por todo el encéfalo, tanto en los ratones silvestres de ambos sexos como en los *KO* machos y hembras, y en todos los grupos experimentales analizados



(Fig. 5). Además, en ningún caso se observa colocación de esta proteína con la NOS1 en las regiones analizadas.

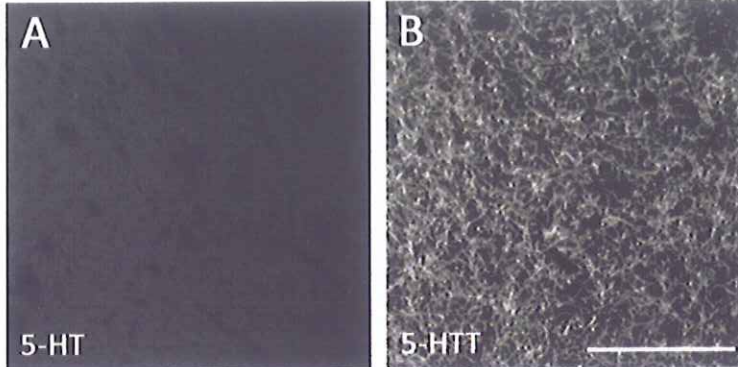


Figura 5: Imagen de estriado de ratón realizada con microscopía de epifluorescencia. No se observa marcaje positivo para serotonina (5-HT; A). Por el contrario, existe una gran cantidad de neuropilo marcado para el transportador de 5-HT (5-HTT; B). Barra de escala: 2 mm.

Cuantificación de elementos nitrérgicos y serotoninérgicos en el encéfalo del ratón

Puesto que los animales *KO* no poseen la NOS1, los resultados de la cuantificación de las neuronas productoras de NO se centran en la cantidad de células NOS1+ en los animales silvestres. Por otra parte, dado que apenas hay neuropilo positivo para 5-HT en las zonas analizadas, y los anticuerpos contra los receptores de serotonina empleados no mostraron un marcaje específico, sólo se pudo analizar el sistema serotoninérgico en dichas zonas mediante visualización del 5-HTT.

Núcleo accumbens

Los animales silvestres sometidos a la adicción a nicotina no muestran alteraciones ni en la densidad de neuronas que expresan NOS1, ni la densidad de píxeles 5-HTT+, comparados con su grupo control tratados con s. salina. Esta igualdad en las densidades se produce tanto en el conjunto de todo el NA, como en las dos regiones analizadas de este núcleo. Además, no existen diferencias entre los machos y las hembras en dichas densidades en ninguno de los grupos experimentales. Al igual que en los ratones silvestres, tampoco hay cambios en la densidad de los píxeles 5-HTT+ entre los ratones *KO* adictos a la droga y sus controles con mini-bombas rellenas de s. salina, así como tampoco existen diferencias sexuales en dicha densidad, ni en la totalidad del NA, ni en ninguna de las regiones analizadas. Asimismo, tampoco existen divergencias en dichas densidades de píxeles 5-HTT+ entre los animales silvestres y *KO*, ya sean machos o hembras.

Al analizar el efecto del estrés y de la abstinencia a la droga tampoco se observan cambios ni en el patrón de marcaje de NOS1, en los ratones silvestres, ni de 5-HTT en los animales silvestres ni *KO* en ninguna de las condiciones analizadas.

Caudado Putamen

En el CP, el tratamiento con nicotina no afecta a la densidad total de neuronas positivas para NOS1 ni a la densidad de píxeles 5-HTT+, ni en los machos ni en las hembras silvestres. Además, en los ratones *KO* tampoco existen cambios significativos al valorar la densidad total de píxeles 5-HTT+, entre los ratones adictos a la nicotina y sus controles tratados con s. salina, independientemente del sexo del animal. Asimismo, en estos grupos experimentales no existen diferencias sexuales, ni en los silvestres, ni en los *KO*. Sin embargo, al analizar por separado las distintas regiones del CP, se observan diferencias regionales en el contenido de células marcadas para NOS1 en las hembras silvestres. Además, la densidad de píxeles 5-HTT+ en los machos *KO* también es diferente dependiendo del área analizada. Dichas diferencias regionales se eliminan con el tratamiento con nicotina.

Al analizar el efecto del proceso de extracción de las mini-bombas, se comprueba que los machos silvestres tratados con s. salina, dos días después de retirarles la bomba contenían una mayor densidad de píxeles 5-HTT+ que las hembras sometidas al mismo tratamiento. Es más, dicha diferencia se produce de manera específica en la zona RL, mientras que el resto de las zonas analizadas no muestran diferencias sexuales. Por el contrario, no se observan dichas diferencias en la densidad de las neuronas NOS1+ (Fig. 6).

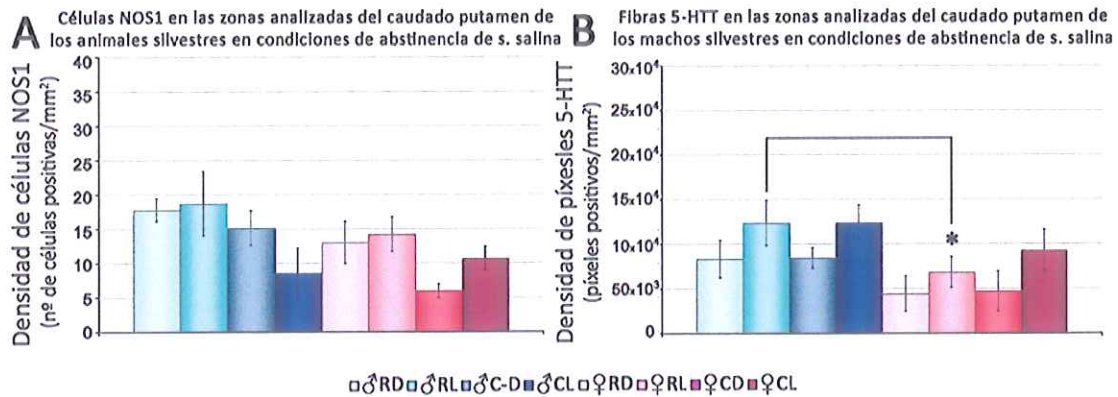


Figura 6. Densidad de células que contienen NOS1 (A) y de fibras 5-HTT positivas (B) en el caudado putamen de los machos y las hembras silvestres en condiciones de "abstinencia de s. salina". Mientras que no hay diferencias sexuales en la densidad de neuronas NOS1+ (A), sí se producen en la densidad de fibras 5-HTT+ (B). Así, la zona rostro-lateral (RL) muestra una densidad de fibras marcadas para 5-HTT significativamente mayor en los machos que en las hembras. Sin embargo, no hay diferencias sexuales significativas ni en la zona rostro-dorsal (RD), ni en la zona caudo-dorsal (CD), ni en la caudo-lateral (CL). * $p < 0,05$.

Por otro lado, al analizar el efecto de la abstinencia a la droga se comprueba que no hay alteraciones en la densidad total de píxeles 5-HTT+ ni en la de células NOS1+ en ninguno de los grupos experimentales analizados. Sin embargo, al analizar las distintas regiones del CP por separado, se comprueba que la abstinencia a la nicotina provoca una redistribución de las neuronas que contienen NOS1 en los machos silvestres: aunque no se producen alteraciones significativas en ninguna de las regiones de los ratones abstinentes a la droga comparados con sus animales abstinentes de s. salina, estos cambios leves son suficientes para provocar dichas diferencias significativas (Fig. 7).

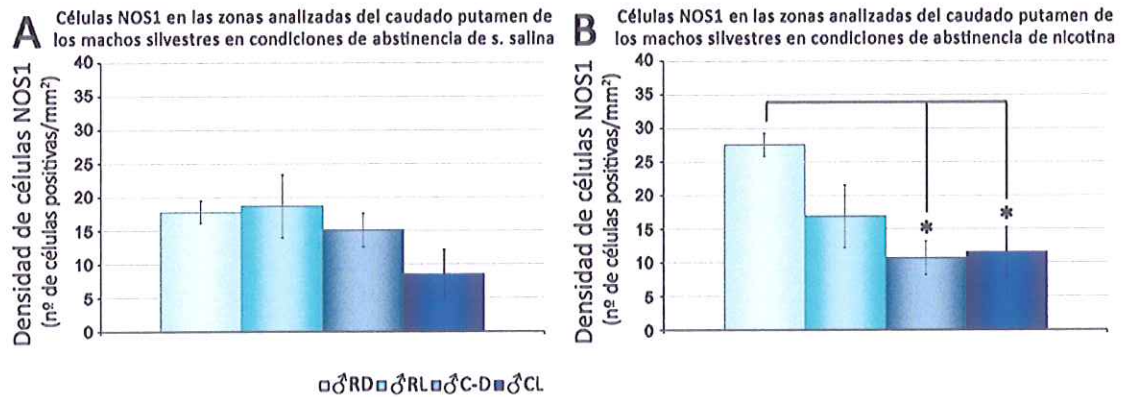


Figura 7. Densidad de células que contienen NOS1 en el caudado-putamen (CP) de los ratones machos silvestres "abstinentes" de s. salina (A) y de nicotina (B). En el CP de los machos silvestres "abstinentes" de s. salina no hay diferencias regionales en el contenido de las neuronas NOS1+. Por el contrario, los machos abstinentes de nicotina muestran una mayor densidad de neuronas nitrérgicas en la zona rostro-dorsal (RD) que la zona caudo-dorsal (CD) y la caudo-lateral. RL: rostro-lateral * $p < 0,05$.

Análisis de la producción de NO en el encéfalo del ratón

Núcleo accumbens

Los animales silvestres tratados con s. salina muestran diferencias sexuales en la cantidad de los metabolitos estables del NO en el NA: los machos tienen una menor liberación de NO que las hembras (Fig. 8).

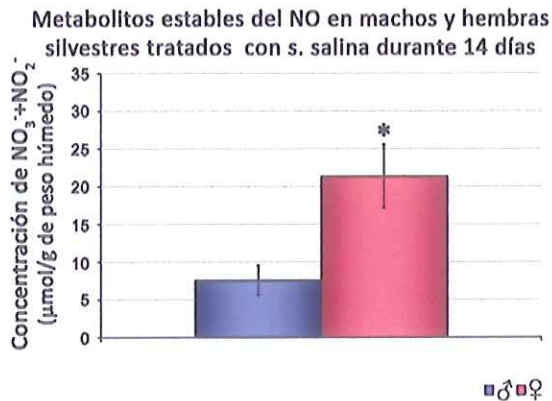


Figura 8. Contenido de los metabolitos estables del NO en el núcleo accumbens de los machos y las hembras silvestres en animales tratados durante 14 días con solución salina. Los machos contienen menor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que las hembras. * $p < 0,05$.

Asimismo, al comparar el contenido de metabolitos estables del NO entre los animales silvestres y los ratones que carecen de NOS1, se observa que los machos silvestres poseen una menor concentración de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ que los machos KO, mientras que no hay diferencias entre las hembras de ambos genotipos. Además, no existen diferencias sexuales en la producción de NO en los KO tratados con s. salina (Fig. 9).

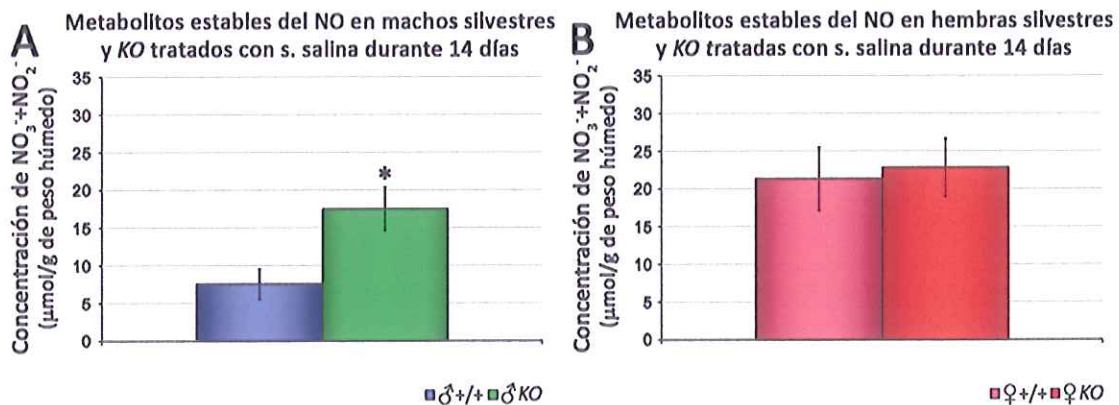


Figura 9. Contenido de metabolitos estables del NO en el núcleo accumbens de los ratones silvestres (+/+) y knock-out (KO) tratados con solución salina durante 14 días. Los machos silvestres contienen menor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que los KO (A). Sin embargo, las hembras no muestran diferencias en la cantidad de metabolitos estables del NO entre ambos genotipos (B). * $p < 0,05$.

Es decir, tanto en los animales silvestres como en los KO tratados con nicotina, la concentración de los metabolitos del NO en el NA no cambia de manera significativa con respecto a los animales tratados con s. salina ni en los machos ni en las hembras. Sin embargo, el tratamiento crónico con nicotina produce alteraciones sutiles en la liberación de NO, de tal forma que “elimina” las diferencias sexuales en la cantidad de los metabolitos del NO que se observan en los ratones tratados con s. salina.



Caudado Putamen

En el CP de los ratones silvestres tratados durante 14 días con s. salina el sexo es determinante en la producción de NO: en los machos es mayor que en las hembras (Fig. 10).

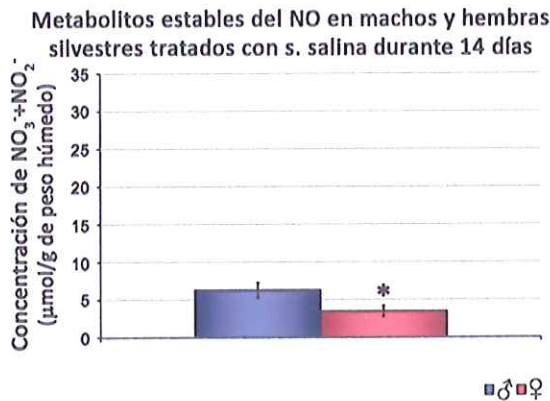


Figura 10: Contenido de los metabolitos estables del NO en el caudado-putamen de los machos y las hembras silvestres tratados con s. salina. Los machos muestran una concentración de NO₃⁻ y NO₂⁻ mayor que las hembras (B). * $p < 0,05$.

Cuando nos centramos en el efecto de la presencia/ausencia de NOS1 para evaluar el ·NO producido en controles (ratones tratados con s. salina durante 14 días) se demuestra que en los machos silvestres este neurotransmisor es mayor que en los KO, pero en las hembras no hay diferencias entre ambos genotipos (Fig. 11). Además, en los animales KO no existen diferencias sexuales en la concentración de los metabolitos del NO, al contrario que en los ratones silvestres sometidos a este tratamiento.

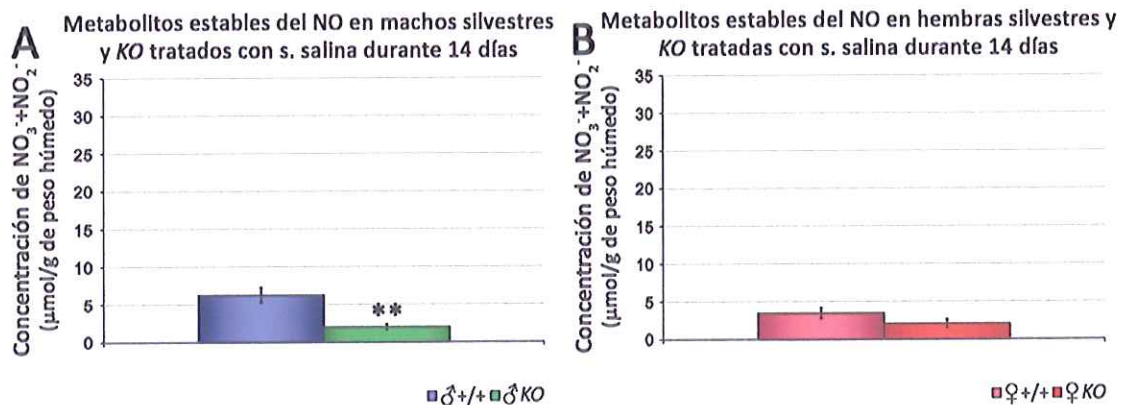


Figura 11. Contenido de metabolitos estables del ·NO en el caudado putamen de los ratones silvestres (+/) y knock-out (KO) tratados con solución salina durante 14 días. Los machos silvestres contienen mayor cantidad de NO₃⁻ y NO₂⁻ que los KO (A). Sin embargo, las hembras no muestran diferencias en la cantidad de metabolitos estables del NO entre ambos genotipos (B). ** $p < 0,01$.

El estudio del CP de los ratones silvestres tratados con nicotina no revela diferencias sexuales significativas en la producción de los metabolitos del NO. Es más, esta producción es similar entre los ratones silvestres y los KO que carecen de la enzima NOS1, tanto en los machos como en las hembras. Además, tampoco hay diferencias sexuales en la concentración de los metabolitos estables del NO en el CP de los ratones KO.

El análisis del efecto de la droga en el CP indica que los animales silvestres tratados con nicotina muestran un descenso en la liberación de NO en esta zona encefálica, con respecto a los que sólo recibieron tratamiento con s. salina. Si bien dicha disminución no llega a ser significativa en las hembras ($p= 0,07$), sí lo es en los machos (Fig. 12). Además, de la misma forma que en el caso del NA, las inyecciones con nicotina eliminan las diferencias sexuales observadas en los animales que fueron tratados sólo con s. salina.

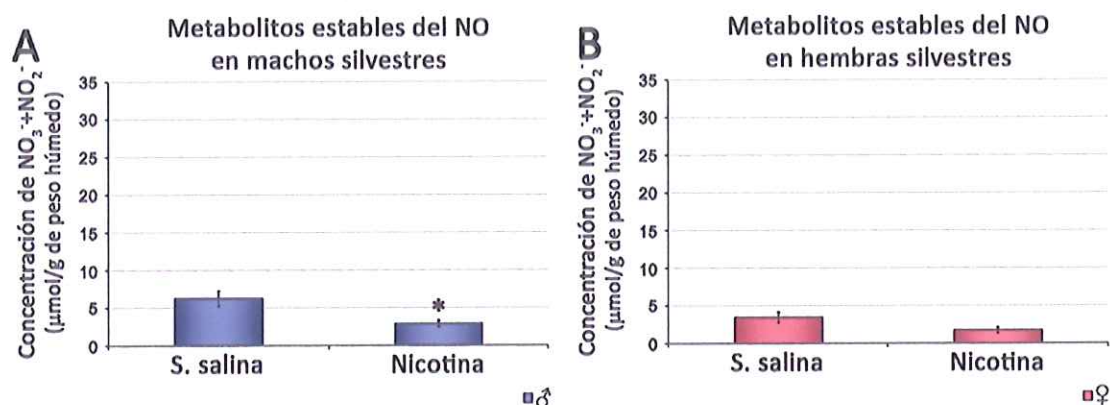


Figura 12. Contenido de los metabolitos estables del NO en el caudado putamen de los machos (A) y las hembras silvestres (B). En los machos tratados con s. salina hay una mayor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que en los inyectados con nicotina. Por el contrario, las hembras no sufren alteraciones significativas en la liberación de NO debidas al tratamiento con la droga. * $p < 0,05$.

Tratamiento crónico con nicotina y control motor

Previamente al comienzo de la administración de nicotina (T1; animales *naïf*) no se observaron diferencias en la coordinación motora entre ninguno de los grupos, ni machos ni hembras, ni animales KO para la NOS1 (Figura 13).

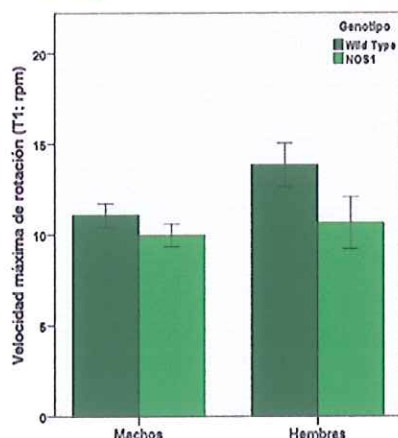


Figura 13: Velocidad máxima en el Rota-rod en animales *naïf* a T1 (situación basal).

No obstante, durante los periodos de tratamiento avanzados (T10, T15) y abstinencia (T17) se observó una mejor coordinación motora de los machos silvestres (WT) respecto de los KO, con independencia del tratamiento; estas diferencias no se hallaron entre las hembras (Fig. 14). Sin embargo, tras la eliminación de la droga (T17) las diferencias sólo eran estadísticamente significativas entre los machos controles, pero no en los tratados con nicotina. Esta diferencia es claramente un dimorfismo sexual: la ausencia de óxido nítrico implica cambios en el control motor (diferencias WT-KO), y esta diferencia también se ve acusada en los machos tratados con nicotina. En definitiva, la presencia de NOS1 se traduce en una mejoría en el control motor, que se ve agudizado en un tratamiento crónico con nicotina, que desaparece en el periodo de abstinencia. Hay que resaltar que las diferencias en el control motor no son debidas al tratamiento con la droga, si no que aparecen sólo con ella y en los ratones que genéticamente no producen óxido nítrico neuronal. Por lo tanto, este hallazgo es importante desde el punto de vista terapéutico: el uso de nicotina



prolongado no parece alterar el control motor, lo que lo haría “no desaconsejable” en usos terapéuticos pro-colinérgicos, en patologías donde pudiera necesitarse, como en déficits generalizados del sistema colinérgico.

Estos resultados difieren completamente de lo hallado por nosotros (Weruaga et al., 2002) y por otros autores (Caldarone *et al*, 2008; Faraday *et al*, 2003) al utilizar vías de administración no-continuas. A diferencia de lo observado en esos tipos de administración de la droga (mediante pinchazos continuados) en nuestros experimentos con bombas subcutáneas no se hallaron diferencias en el patrón de locomoción general ni en las medidas de ansiedad en ninguno de los sexos, ni en el periodo de abstinencia.

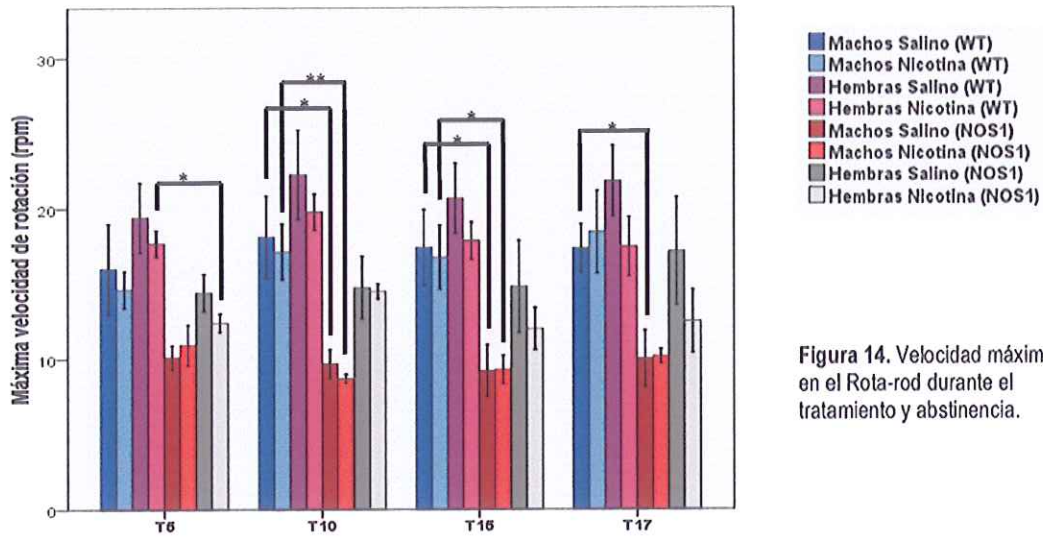


Figura 14. Velocidad máxima en el Rota-rod durante el tratamiento y abstinencia.

Ello no obstante, observamos un mayor número defecaciones en los machos KO que en los machos silvestres, en los controles (“tratados” con solución salina) a T5 y T10; estas diferencias no existían en el mismo tipo de animales pero que fueron tratados con nicotina. De esta manera se refuerza el papel ansiolítico de la nicotina, pero también con un marcado dimorfismo sexual -sólo en machos- y con dependencia de la producción de óxido nítrico (Fig. 15). Resumiendo, la nicotina podría servir de ansiolítico en aquellos sujetos machos y que no tuvieran grandes cantidades de óxido nítrico, pero no en los sujetos estándar.

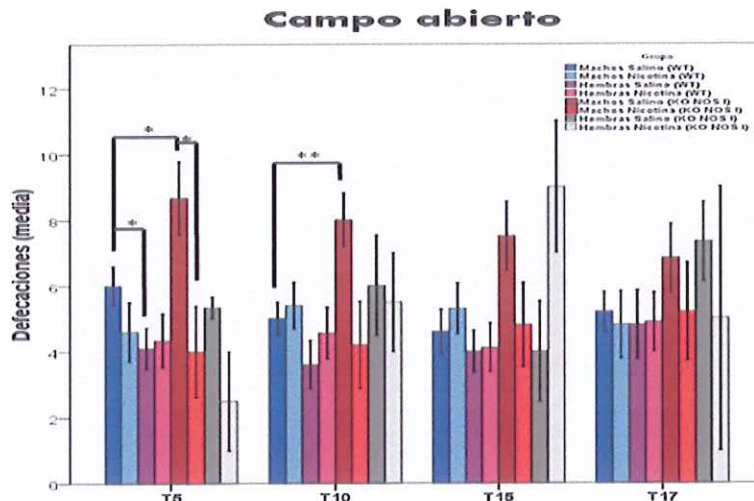


Figura 15. N.º de defecaciones en el campo abierto durante el tratamiento y abstinencia.



El óxido nítrico no parece ejercer efectos sobre los parámetros estudiados, salvo en la reactividad emocional frente al estrés (defecaciones) al inicio del tratamiento con nicotina y en la prueba de *rota-rod*, la cual podría estar influenciada por la importancia de este neurotransmisor en la inducción de *long-term depression* (LTD) en el cerebelo.

Estas consideraciones apuntan a que la administración constante y continua de nicotina ejerza efectos en la locomoción y reactividad emocional diferentes a otras vías de administración, como la administración discontinua (intravenosa o subcutánea), con un dimorfismo sexual.

3. CONCLUSIONES Y PROSPECTIVA

Se ha comprobado que el NO \cdot contribuye a la sensibilización a diversas drogas, como la cocaína, modificando la neurotransmisión dopaminérgica (Balda et al., 2009). Además, se ha demostrado que los ratones KO, contienen una menor cantidad de neuronas TH+ en el área tegmental ventral que los animales silvestres, por lo que la regulación de la “vía del placer-recompensa” estaría afectada (Balda et al., 2009). De hecho, se ha comprobado que estos ratones tienen una menor sensibilidad a la cocaína (Balda et al., 2009). Es más, en la rata se ha demostrado que la nicotina estimula la producción de NO en el hipocampo (Fedele et al., 1998). Por el contrario, los estudios en ratones demuestran que el estrés produce una disminución la cantidad de células NOS1+ así como de la producción de NO en el hipocampo (Palumbo et al., 2007), lo que está en general de acuerdo con nuestros resultados.

Diversos estudios han demostrado que la NOS1 modula la depresión inducida por estrés crónico, así como diversos comportamientos inducidos por estrés, afectando de manera específica al sistema serotoninérgico (Zhang et al., 2010). Es más, se ha comprobado, que en el ratón, los núcleos del rafe contienen neuronas NOS1+; aunque no existen muchas células que co-expresen 5HT, hay una moderada red de fibras positivas a NOS1 en el rafe (Fu et al., 2010). De hecho, se ha comprobado que los ratones KO para la NOS1 tienen afectado dicho sistema (Tagliaferro et al., 2003). Por lo tanto, la carencia de NOS1 podría estar afectando al sistema serotoninérgico a nivel de los núcleos del rafe y no sólo en los núcleos del estriado estudiados.

En el ratón, existen terminales positivos al factor liberador de corticotropina (CRF; Fu et al., 2010). El CRF es un elemento clave en la ruta de activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, que está implicado a la respuesta al estrés. Se ha postulado que el CRF en los núcleos del rafe afectaría a los disparos de las neuronas serotoninérgicas de dichos núcleos (Price et al., 1998; Kirby et al., 2000; Lowry et al., 2000). Por lo tanto, los cambios en el sistema serotoninérgico debidos al estrés de las operaciones para provocar la abstinencia puede ser consecuencia de un cambio en dichas neuronas positivas a 5HT del rafe, y no tanto a un cambio a nivel del hipocampo o del área tegmental ventral.

A pesar de que las bombas osmóticas son una herramienta experimental que evita el estrés de la inyección (Doucette et al, 2000) no parece ser idónea para simular una sensibilización a la nicotina apropiada, ya que con este método sólo se producen efectos en la coordinación motora (*Rota-rod*), pero no en la actividad locomotora (campo abierto) y la reactividad emocional generales (campo abierto). De esta manera, estos resultados apoyarían el uso de terapias de infusión continua de nicotina (parches transdérmicos, bombas de infusión) para otras patologías nerviosas en las que fuera necesaria una activación basal general del sistema colinérgico.

Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y. The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett.* 2009; 457:120-124.

Caldarone BJ, King SL, Picciotto MR. Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following chronic nicotine exposure in mice. *Neurosci Lett.* 2008; 439:187-191.



- Doucette TA, Ryan CL, Tasker RA. Use of osmotic minipumps for sustained drug delivery in rat pups: effects on physical and neurobehavioural development. *Physiol Behav.* 2000;71:207-212.
- Faraday MM, Elliott BM, Phillips JM, Grunberg NE. Adolescent and adult male rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 74:917-931.
- Fu W, Le Maître E, Fabre V, Bernard J-F, Xu Z-QD, Hökfelt T. Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2010; 518:3464-3494.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR. Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains. Amsterdam: Elsevier Science, B.V., 2000.
- Kirby LG, Rice KC, Valentino RJ. Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology.* 2000; 22:148-162.
- Lowry CA, Rodda JE, Lightman SL, Ingram CD. Corticotropin-releasing factor increases in vitro firing rates of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for activation of a topographically organized mesolimbocortical serotonergic system. *J Neurosci.* 2000; 20:7728-7736.
- Palumbo ML, Fosser NS, Rios H, Zorrilla Zubilete MA, Guelman LR, Cremaschi GA, Genaro AM. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *J Neurochem.* 2007; 102:261-274.
- Price ML, Curtis AL, Kirby LG, Valentino RJ, Lucki I. Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. *Neuropsychopharmacology.* 1998; 18:492-502.
- Weruaga E, Balkan B, Koylu EO, Pöğün S, Alonso JR. Effects of chronic nicotine administration on nitric oxide synthase expression and activity in rat brain. *J Neurosci Res.* 2002; 67:689-697.
- Zhang J, Huang XY, Ye ML, Lou CX, Wu HY, Hu Y, Zhou QG, Wu DL, Zhu LJ, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci.* 2010; 30:2433-2441.
- Zhou FC, Xu Y, Bledsoe S, Lin R, Kelley MR. Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 43:267-278.

ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN:

(Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

En los siguientes trabajos publicados por el grupo de investigación aparece expresamente el agradecimiento al Plan Nacional Sobre las Drogas:

Artículos científicos:

- Sexual dimorphic stages affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream.**
Díaz D., Valero J., Airado C., Baltanás F.C., Weruaga E. *, Alonso J.R.
Experimental Neurology (2009), 216:357-364.
- Albumin attenuates DNA damage in primary cultured neurons.**
Baltanás F.C., Weruaga E.*, Valero J., Recio J.S., Alonso J.R.
Neuroscience Letters (2009), 450:23-26.
- Chemical characterization of Pax6-immunoreactivity periglomerular neurons in the mouse olfactory bulb.**
Baltanás F.C., Weruaga E. *, Murias A.R., Curto G.G., Gómez C., Alonso J.R.
Cellular and Molecular Neurobiology (2009), 29:1081-1085.
- Types of cholecystokinin-containing periglomerular cells in the mouse olfactory bulb.**
Baltanás F.C., Curto G.G., Gómez C., Díaz D., Murias A.R., Crespo C., Erdelyi F., Szabó G., Alonso J.R., Weruaga E.
Journal of Neuroscience Research (2011), 89:35-43.
- Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells.**
Baltanás F.C., Casafont I., Weruaga E., Alonso J.R., Berciano M.T., Lafarga M.
Brain Pathology (2011), 21: 374-388.



6. **Long-lasting changes in the anatomy of the olfactory bulb after ionizing irradiation and bone marrow transplantation.**
Díaz D., Recio J.S., Baltanás F.C., Gómez C., Weruaga E.*, Alonso J.R.* (*contribución equitativa)
Neuroscience (2011), 173:190-205.
7. **Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system by different mechanisms of plasticity.**
Recio J.S., Álvarez-Dolado M., Díaz D., Baltanás F.C., Piquer M., Alonso J.R., Weruaga E.
Cell Transplantation (2011), 20:1179-1192.
8. **Purkinje cell degeneration in *pcd* mice reveals large-scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair.**
Baltanás F.C., Weruaga E., Alonso J.R., Berciano M.T., Lafarga M.
Journal of Biological Chemistry (2011), 286:28287-28302.
9. **Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells.**
Díaz D., Recio J.S., Weruaga E., Alonso J.R.
Cell Transplantation (2011), en prensa.
10. **Changes in the serotonergic system and in BDNF distribution in the main olfactory bulb of PCD mice before and after mitral cell loss.**
Gómez C., Curto G.G., Baltanás F.C., Valero J., O'Shea E., Colado M.I., Díaz D., Weruaga E., Alonso J.R.
Neuroscience (2011), en prensa.

Comunicaciones en congresos:

- XIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia.
Tarragona, septiembre 2009.
pp. 170.
pp. 172
pp. 219.
- XIII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular.
Murcia, diciembre 2009.
Comunicación oral
- VI Congreso Neurociencias de Castilla y León
Ávila, septiembre 2010
C1
CO1.3.
CO3.1.
CO3.3.
- XIV Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia.
Salamanca, septiembre 2011.
nº 311-323-CIII-91
nº 309-321-CI-107
nº 318-330-CI-121
nº 10614-331-CI-122
- 7th Forum of European Neuroscience
Amsterdam, julio 2010.
FENS Abstr., vol.5, 052.11, 2010

Tesis Doctorales Relacionadas con el proyecto

- Modulación de la adicción a nicotina por el sistema nitrérgico: estudio con ratones mutantes.*
Tesis doctoral de la Universidad de Salamanca.
Autora: Azucena Rodrigo Murias.
Directores: Eduardo Weruaga Prieto y José Aijón Noguera
Fecha de lectura: 27 de julio de 2011.
Calificación: Sobresaliente *cum laude* (unanimidad).



Tesinas de máster relacionadas con el proyecto

Estudio del tratamiento continuo de nicotina en el patrón general de locomoción y coordinación motora de ratones machos y hembras.

Trabajo fin de Máster en Neurociencias, Universidad de Salamanca.

Autor: Rodrigo Muñoz Castañeda.

Director: Eduardo Weruaga Prieto.

Fecha de lectura: junio 2011.

Calificación: 9,2/10

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

Algunos anticuerpos contra los receptores de serotonina no resultaron efectivos, por lo que se han tenido que probar nuevos anticuerpos dirigidos contra dichos receptores y distintas metodologías de detección de los mismos. Por el contrario, los resultados preliminares que se han obtenido con los anticuerpos para la detección de la NOS1, la 5-HT y el transportador de 5-HT han sido bastante satisfactorios.

OBJETIVOS PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

1. Comprobar el efecto de la adicción a nicotina en los ratones tratados crónicamente con nicotina y de su abstinencia una vez suspendido el tratamiento mediante la realización de test comportamentales.
2. Analizar los cambios en la producción de óxido nítrico cerebral en regiones relacionadas con la adicción a drogas de abuso (estriado, núcleo accumbens, área tegmental ventral), el procesamiento cognitivo (hipocampo) y la principal fuente de serotonina del encéfalo (núcleos del rafe). Esta valoración se realizará midiendo los metabolitos estables del óxido nítrico (nitratos y nitritos) en ratones con un tratamiento crónico con nicotina y tras diferentes periodos de cese de la administración de la droga, para comprobar los efectos de la nicotina y su abstinencia.
3. Estudiar la influencia de la nicotina en el sistema serotoninérgico en los ratones sometidos a las condiciones anteriores mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución de la serotonina y su principal metabolito, el ácido indolacético, en dichos centros cerebrales.
4. Analizar cualitativa y cuantitativamente las poblaciones celulares implicadas en la producción de óxido nítrico y serotonina localizadas en dichas regiones encefálicas en las mismas condiciones de administración de nicotina y abstinencia, mediante un estudio inmunohistoquímico (NOS1; serotonina; transportador de serotonina; receptores de serotonina 1A, 2C y 3).
5. Comprobar el contenido de diversas proteínas relacionadas con el sistema nitrérgico (NOS1) y serotoninérgico (transportador de serotonina y receptores de serotonina 1A, 2C y 3) mediante *western-blot* en los tratamientos antes mencionados.
6. Realizar los experimentos propuestos en los objetivos anteriores en la estirpe de ratón B6;129S4-*Nos1^{tm1Plh}*, *knock-out* para la NOS1 para comprobar la influencia de la nicotina sobre el sistema serotoninérgico a través de dicha enzima.
7. Efectuar dichos estudios en ratones hembras, tanto silvestres como *knock-out* para la NOS1. Esto nos permitirá valorar la influencia del sexo sobre los sistemas serotoninérgico y nitrérgico en la adicción y cese del tratamiento con nicotina.

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)



1. Este objetivo se ha alcanzado, utilizando como método para la administración de nicotina las bombas subcutáneas. Este método arroja resultados diferentes a los de las inyecciones con la droga (estudiados previamente por otros autores): se producen efectos en la coordinación motora pero no en la actividad motora y reactividad general. Los efectos sobre la coordinación motora tienen diferencias sexuales y en relación a la producción de óxido nítrico neuronal, pero no en relación a una adicción a la nicotina; es decir, sólo los machos sin NOS neuronal tienen peor coordinación motora que los de su mismo sexo silvestres (genéticamente estándar), con independencia de ser tratados o no con la droga. Eso sí, en periodo de abstinencia esta diferencia sólo se plasma en los ratones controles (KO vs. Silvestre), pero no en los tratados con nicotina.
 - Como estos resultados se contradicen con los encontrados por los otros métodos de administración empleados por nosotros (en este proyecto) y por otros autores, hemos decidido realizar controles de la cantidad de nicotina y conitina en sangre. Este procedimiento se ha convertido en un nuevo “objetivo” que validaría completamente el uso de bombas osmóticas para otros fines terapéuticos. Sin embargo, no hemos conseguido hasta el momento resultados satisfactorios en el Servicio de HPLC de la USAL por la baja muestra. Estamos realizando ensayos para validar esta cuestión utilizando kits comerciales que detecten nicotina por ELISA, aunque este procedimiento se exceda en planteamiento, tiempo y coste del proyecto planteado.
2. Algunos de los resultados se presentaron en la primera anualidad. La administración continuada de nicotina mediante inyecciones elimina las diferencias sexuales existentes en el \cdot NO liberado en el cerebro en los animales silvestres. En los ratones KO no hay cambios en la liberación de NO debidos al tratamiento con nicotina, ni en el NA ni en el CP (caudado putamen); ni hay diferencias sexuales. Es más, en el NA (núcleo accumbens) de los ratones tratados con nicotina, la producción de \cdot NO es menor en los machos silvestres que en los KO. Por el contrario, en el CP, el tratamiento con nicotina elimina las diferencias en la liberación de NO entre los machos silvestres y KO, que se producían debido al tratamiento con s. salina. Estos resultados sugieren que, en los animales silvestres, los cambios en la cantidad de metabolitos estables del \cdot NO en respuesta al tratamiento de nicotina podrían deberse a la actividad de la enzima. Resumiendo, el estrés que producen las inyecciones continuas se manifiesta en una liberación diferencial de \cdot ON, siendo mayor en los machos que en las hembras; la nicotina elimina estas diferencias. Por tanto la acción de la nicotina en el sistema nitrérgico modifica el patrón previamente modificado por el estrés. Ello no depende de óxido nítrico “neuronal”.
 - No se ha podido realizar la valoración de nitratos y nitritos en el rafe porque la cantidad producida en estos núcleos en el ratón está por debajo de la capacidad resolutoria de la técnica, pero sí en las otras regiones.
3. La consecución de este objetivo se ha visto retrasada puesto que en el servicio de HPLC de la USAL no tenían puesto a punto el método de detección de la serotonina y sus metabolitos, aunque disponemos de una parte de las muestras y estamos completando los grupos experimentales hasta disponer de un número de individuos adecuado para poder realizar los análisis estadísticos. También nos planteamos la posibilidad de realizar estas mediciones en otros servicios externos, como hemos realizado para otras publicaciones (Univ. Autónoma de Madrid): los costes de utilización (externa), envío de muestras, y envío de personal sobrepasan la financiación adjudicada a este proyecto.
4. Algunos de los resultados se presentaron en las anualidades anteriores. Dado que los anticuerpos que hemos empleado para la detección de los receptores de serotonina 1A, 2C y 3 que no han funcionado de manera adecuada, el estudio del sistema serotoninérgico se realizó mediante el análisis del marcaje positivo para la 5-HT y para el transportados de 5-HT. El tratamiento crónico con nicotina y el estrés son dos factores que alteran el sistema serotoninérgico y nitrérgico de forma diferente en los distintos núcleos encefálicos analizados, de forma dependiente del sexo y de la presencia de la NOS1. Es más, su efecto es diferente si se presentan de forma independiente (experimentos de tratamiento crónico a la nicotina y “abstinencia” de la s. salina) o de forma conjunta (experimento de



abstinencia a la nicotina).

5. Algunos de los resultados se presentaron en la primera anualidad, en localización in situ, y otros en esta anualidad. El alto coste del *western blot* nos lleva a eliminar grupos experimentales para este propósito ya que hemos empleado diversos anticuerpos para la detección de los receptores de serotonina 1A, 2C y 3 que no han funcionado adecuadamente para la realización de dicha técnica. Nos planteamos el un futuro próximo comenzar el estudio sólo con muestras de animales silvestres.
6. Este objetivo consistía en estudiar los puntos anteriores en el ratón privado genéticamente de la NOS1 (KO). Este objetivo se realiza en paralelo en los objetivos 1, 2, 3, 4, pero no para el 5, como se ha mencionado previamente.
7. Este objetivo consistía en estudiar los puntos anteriores entre machos y hembras. Este objetivo se realiza en paralelo en los objetivos 1, 2, 3, 4, pero no para el 5, como se ha mencionado previamente.

APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS. (En caso de memoria final)

El conocimiento de estos datos es previo a una serie de experimentos en los que se evaluará la inhibición farmacológica de la NOS1 y del transportador de 5-HT, con una batería de sustancias específicas y que servirá, a medio plazo, como base para el comienzo de estudios clínicos en humanos, encaminados a la ayuda en el cese del hábito de fumar.

En relación con los principales resultados obtenidos en este proyecto, podemos obtener dos grandes recomendaciones, que deberían ser testadas como más estudios:

a) A pesar de que las bombas osmóticas son una herramienta experimental que evita el estrés de la inyección no parece ser idónea para simular una sensibilización a la nicotina apropiada, ya que con este método sólo se producen efectos en la coordinación motora (Rotarod), pero no en la actividad locomotora (campo abierto) y la reactividad emocional generales (campo abierto). De esta manera, estos resultados apoyarían el uso de terapias de infusión continua de nicotina (parches transdérmicos, bombas de infusión) para otras patologías nerviosas en las que fuera necesaria una activación basal general del sistema colinérgico.

b) La evaluación terapéutica tanto para proponer terapias conductuales o farmacológicas encaminadas a la deshabituación tabáquica se realizaría en base a la relación de los fumadores con perfiles de alto estrés; es decir, en pacientes psiquiátricos con alteraciones debidas al estrés (con ansiedad en cualquier grado) y fumadores que hayan intentado dejar el hábito varias veces y hayan recaído. Esta recomendación, bastante intuitiva por parte de los profesionales de la salud y el público general, cada vez tiene más evidencias biológicas, entre las cuales podemos sumar algunos de los resultados de este proyecto.

PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO. (En caso de memoria final)

OTRAS SUBVENCIONES O AYUDAS RECIBIDAS PARA ESTE PROYECTO: origen, cantidad, en qué se aplica

No existen otras subvenciones específicas para este proyecto.



OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

Durante el transcurso de este Proyecto, ha habido las siguientes incidencias de personal:

- Dña. Gloria González Curto ha sido contratada con este proyecto hasta el 20 de noviembre del año 2009, pero ya no trabaja en la universidad de Salamanca. En 2011 se contrató a Dña. Estefanía Sastre Eleno por tres meses, adquiriendo las mismas responsabilidades.
- En el presente año se contrató a D. Rodrigo Muñoz Castañeda para las mismas funciones, pero presentó baja en el puesto por conseguir un contrato de investigación predoctoral bajo mi dirección. Su labor fue tomada por D. David Díaz López hasta noviembre de 2011 por cinco meses.
- La Dra. Carmela Gómez ya no trabaja en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Actualmente está contratada como postdoctoral en el Instituto de Investigación del Cáncer en Salamanca. A pesar de ello, sigue colaborando con el proyecto, fundamentalmente en la detección de elementos serotonérgicos y en la facilitación de los análisis por HPLC.
- El Dr. Fernando Calvo Baltanás ya no trabaja en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Actualmente está contratado como postdoctoral también en el Instituto de Investigación del Cáncer en Salamanca. A pesar de ello, sigue colaborando con el proyecto, fundamentalmente en el genotipado de los animales y en la valoración de elementos nitrérgicos.
- El Prof. Alonso Peña desempeña el puesto de Director General de Políticas Culturales de la Consejería de Cultura y Deportes de la Junta de Castilla y León desde mediados de julio 2011, aunque sigue colaborando en el proyecto de facto.
- Doña Azucena Rodrigo Murias obtuvo el título de Doctor en julio de 2011.
- Don David Díaz López obtuvo el título de Doctor Europaeus en julio de 2011, y fue Premio Extraordinario de Doctorado.
- Don Rodrigo Muñoz Castañeda obtuvo su título de Máster en Neurociencias en julio de 2011.

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

En Salamanca, a 8 de marzo de 2012

Fdo. Eduardo Weruaga Prieto