

ANEXO IV

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

FINAL

Investigador Principal:

ANTONIO ARMARIO GARCÍA

ARMARIO GARCÍA

Catedrático de Universidad

Doctor en Biología

Unidad de Fisiología Animal e Instituto de Neurociencias

Facultad de Biociencias, UAB

Título Proyecto o subproyecto : La pre-exposición a la cocaína como factor de vulnerabilidad al estrés: posible sustrato neurobiológico y papel del CRF

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

Organismo: Universidad Autónoma de Barcelona

Centro: Instituto de Neurociencias

Departamento: Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Unidad de Fisiología Animal

Comunidad Autónoma: Catalunya

Duración: 3 años

Fecha de inicio: Octubre 2007

Fecha de finalización: Septiembre 2010

Año Convocatoria: 2007

Área Temática:

Investigaciones sobre comorbilidad psiquiátrica y determinantes neuropsicológicos en pacientes drogodependientes, fundamentalmente cocainómanos.

Palabras Clave:

Comorbilidad, estrés, psicoestimulantes, ansiedad, depresión, modelos animales, trastorno de estrés post-traumático, ACTH, corticosterona, CRF, eje hipotalámico-pituitario-adrenal

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

El objetivo del presente proyecto es estudiar como el impacto de un estímulo estresante de intensidad elevada como es la inmovilización en plancha sobre la conducta y la fisiología del SNC se ve modificado por la administración aguda y crónica de cocaína. Los sujetos de estudio son ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Se utilizan técnicas conductuales (laberinto elevado en forma de cruz, respuesta acústica de sobresalto, consumo de sacarina, prueba de natación forzada), bioquímicas (radioinmunoanálisis para determinación de niveles de ACTH y corticosterona) e histoquímicas (doble marcaje con c-fos y otros marcadores para caracterizar el fenotipo de las neuronas activadas). Los resultados indican que ciertos efectos negativos de la inmovilización no se ven afectados por la administración de cocaína, obteniéndose en otras ocasiones un efecto sumatorio (pero no una interacción entre ambos estímulos). Un objetivo futuro es la caracterización del substrato neuroanatómico de la interacción entre cocaína y estrés.

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

aún no se ha tenido el tiempo suficiente tiempo para publicar los resultados directos del proyecto, pero sí otros datos obtenidos con anfetamina, droga que nos ha servido de base, por nuestro mejor conocimiento de la misma, para los planteamientos del presente proyecto. También se ha publicado una revisión sobre los efectos de las drogas, Incluyendo cocaína, sobre el eje hipotalámico-pituitario-adrenal:

Gagliano H, Andero R, Armario A, Nadal R: Repeated amphetamine administration in rats revealed consistency across days and a complete dissociation between locomotor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis effects of the drug. *Psychopharmacology* 207, 447-459, 2009.

Rotllant D, Márquez C, Nadal R, Armario A.: The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits. *Neuroscience* 168, 691-705, 2010.

Armario A: Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by addictive drugs: different pathways, common outcome. *Trends in Pharmacological Sciences* 31: 318-325, 2010.

COMUNICACIONES ORALES

Nadal, R: Intervenciones tempranas en la adolescencia y repercusiones en la vida adulta en ratas. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROCIENCIAS. Tarragona, Septiembre 2009.

Rotllant, D., Nadal, R. Armario, A: Simultaneous exposure of rats to immobilization stress and amphetamine administration reveals activation of the same neuronal populations in a wide range of brain areas. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROCIENCIAS. Tarragona, Septiembre 2009.

Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, MA., Rodríguez-Arias, M., Nadal, R., Armario, A., Guerri, C., Summavielle, T., Miñarro, J.: Pre-exposure to ethanol and MDMA during adolescence Increases the conditioned rewarding effects of MDMA and drug-induced reinstatement. RED DE TRASTORNOS ADICTIVOS MEETING. Tarragona, Septiembre 2009.

COMUNICACIONES ESCRITAS (POSTERS)

Rotllant D., Nadal R. y Armario A: Activation of arginine-vasopressin, corticotropin releasing factor and oxytocin neurons by acute amphetamine administration. 6TH FENS FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE SOCIETY. Ginebra, Suiza, Julio 2008.

Gagliano H., Andero R., Nadal R. y Armario A: Consistency of pituitary-adrenal axis activation and motor activity induced by amphetamine in rats. 6TH FENS FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE SOCIETY. Ginebra, Suiza, Julio 2008.

Rosa RPS, Nadal R., Armario A: Interaction between simultaneous cocaine and immobilization treatments in rats. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DRUG OF ABUSE. Açores, Portugal, Julio 2008.

Rotllant D., Nadal R., Armario A: Pattern of brain c-fos induction by amphetamine in rats. An approach using factorial analysis and double-labelling of dopaminergic and serotonergic areas. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE MEETING. Washington, USA, Noviembre 2008.

Rosa, RPS, Nadal, R, Armario, A: Simultaneous cocaine and immobilization treatments in rats: effects on hypothalamic pituitary-adrenal axis. FENS, 2010, Amsterdam, Holanda.

Rosa, RPS, Nadal, R, Armario, A: Simultaneous cocaine and immobilization treatments in rats: Response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to homotypic and heterotypic stimuli. 7th World Congress on Stress, 2010, Leiden, Holland.

Rotllant D, Nadal R, Armario A: Dynamics of histone H3 phosphorylation after acute amphetamine administration in the rat striatum. Society for Neuroscience, 2010, San Diego, USA.

TRABAJOS EXPERIMENTALES DE MÁSTER Y TESIS DOCTORALES

Tesis doctoral defendida.

"Activación del sistema nervioso central por el estrés y la anfetamina: Relación entre estrés, adicción y diferencias individuales" presentada por David Rotllant. Programa de Doctorado de Neurociencias (UAB, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología). Calificación: Sobresaliente por unanimidad. Codirección: Antonio Armario y Roser Nadal.

Tesis doctoral en fase de redacción

Además, el trabajo realizado con cocaína ha permitido la presentación y defensa del trabajo experimental correspondiente al doctorado en Neurociencias por parte de Rui Pedro Santos Rosa (Febrero de 2009), bajo el título: *Interaction between simultaneous cocaine and immobilization treatments in rats*. El trabajo ha estado codirigido por A Armario y R Nadal. Actualmente está en fase avanzada de redacción la tesis correspondiente de Pedro Rui Rosa, codirigida por los investigadores citados.

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

Ha habido un aspecto del trabajo que no se ha podido estudiar directamente: el uso de antagonistas no peptídicos del CRF, dado que agotamos el que disponíamos y ha sido prácticamente imposible obtener más compuesto por razones internas de las compañías farmacéuticas. Actualmente estamos solicitando otro similar a Lilly que esperamos utilizar aunque sea fuera de plazo del proyecto.

OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)

- 1) Demostrar que la exposición previa a la cocaína acentuaría los efectos fisiológicos y conductuales negativos de la exposición a una situación estresante de gran severidad, como es la inmovilización en planchas (IMO). Los efectos a estudiar serían la respuesta del eje HPA, así como cambios conductuales relacionados con ansiedad y depresión (laberinto elevado en cruz, respuesta de sobresalto, anhedonia y nivel de inmovilidad en la prueba de la natación forzada).
- 2) Demostrar que la exposición crónica a la cocaína acentuaría más que la exposición aguda los efectos negativos de la IMO. Además, estos efectos negativos serían especialmente notables tras la retirada de la droga después de un periodo de administración crónica.
- 3) Caracterizar el posible substrato neurobiológico de la interacción entre cocaína y estrés, estudiando la inducción de c-fos en áreas clave del SNC mediante técnicas de hibridación *in situ*.
- 4) Demostrar un papel clave del CRF en la interacción cocaína-estrés estudiando: (a) la expresión del gen para el CRF en diversas zonas del SNC, mediante hibridación *in situ*; (b) la colocalización de c-fos en neuronas CRF positivas con técnicas de doble marcaje; (c) los efectos de un antagonista no peptídico selectivo para el receptor tipo 1 del CRF.

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) Hemos realizado cuatro experimentos en los que se ha estudiado como se afecta el impacto de una exposición a un estrés de elevada intensidad (inmovilización en plancha, IMO) en animales que han sido previamente expuestos a una inyección aguda de cocaína, tal y como estaba previsto. Las variables analizadas han sido: a) consumo y preferencia por soluciones dulces (sacarina), como medida de anhedonia, b) ingesta de comida y ganancia de peso, como medida de anorexia, c) respuesta acústica de sobresalto y laberinto elevado en forma de cruz, como medidas de ansiedad, d) conducta activa/pasiva en la prueba de natación forzada, como medida de las estrategias de afrontamiento delante de situaciones estresantes, e) respuesta plasmática (ACTH y corticosterona) tras la inmovilización en plancha y tras la cocaína. De los cuatro experimentos hemos repetido uno de ellos (laberinto elevado en cruz y natación forzada) puesto que hemos tenido problemas técnicos. Nuestros resultados (que han sido presentados en un congreso internacional, Rosa et al. 2008, y presentados en de *Masther Thesis*) indican, o bien que la cocaína por sí sola no tiene efectos, o bien que ciertos efectos de la cocaína y de la inmovilización son

simplemente sumatorios, no existiendo nunca una interacción entre ambos estímulos (excepto en el caso de los efectos anoréxicos de la inmovilización donde parece que la cocaína protege parcialmente de dichos efectos). Respecto de la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, tanto la inmovilización como la cocaína lo activan, pero la cocaína con mucho menos intensidad que la IMO. En cualquier caso, la combinación de cocaína e IMO redujo ligeramente la respuesta a la IMO, sugiriendo algún tipo de sinergia negativa, efecto que también hemos observado de forma más contundente con la anfetamina.

Como continuación de dichos estudios, hemos demostrado que la administración concomitante de cocaína e IMO afecta a la desensibilización a largo plazo del eje HPA causada por una sola exposición a la IMO. Esta desensibilización de la respuesta a la misma situación estresante (estrés homotípico) ha sido repetidamente observada en nuestro laboratorio y tiene similitudes con la adaptación al estrés crónico. Nuestros resultados indican que la cocaína *per se* no tiene efectos a largo plazo (una semana) sobre la respuesta a una IMO, pero en cambio interfiere con la desensibilización homotípica del eje HPA. Estos resultados, de gran importancia teórica, sugieren que la exposición al estrés bajo los efectos de la cocaína podría empeorar la adaptación al estrés.

2) Hemos realizado un estudio (Gagliano et al, no publicado) en el que se ha evaluado como la administración crónica de cocaína modifica los efectos a largo plazo de la exposición aguda a una inmovilización en plancha (IMO). Los resultados muestran que el tratamiento diario con cocaína causa activación del eje HPA que se amortigua poco por la administración repetida. El tratamiento aumenta los niveles basales de ACTH y corticosterona valorados a las 24 h de la última inyección. Además, cuando los animales fueron expuestos a las 24 h de la última inyección a una IMO aguda de 1 h, la administración previa de cocaína tendió a reducir (no significativamente) la respuesta de la ACTH y la corticosterona a la IMO. Cuando se estudiaron las consecuencias de la IMO a las 24 h del estrés y el posible efecto de la historia previa de cocaína, se observó que los animales inmovilizados mostraban signos de una ansiedad incrementada en el laberinto elevado en cruz (EPM) y la administración previa de cocaína no alteró *per se* la ansiedad, pero tendió a potenciar los efectos de la IMO. Por otro lado, la respuesta hormonal al EPM puso de manifiesto el efecto sensibilizador de la IMO, efecto que no se vio modificado por la historia previa de cocaína ni en los animales no estresados ni en los expuestos a la IMO. Una historia previa de administración crónica de cocaína no alteró los niveles de escape activo (*struggling*) en la prueba de la natación forzada, pero la IMO previa redujo moderadamente los niveles de inmovilidad, efecto que no se vio alterado por la cocaína. En conjunto, estos datos que la exposición previa a la cocaína no sensibiliza frente a los efectos neuroendocrinos de una inmovilización aguda ni interfiere con las estrategias de

afrontamiento en la prueba de la natación forzada, pero podría exacerbar el impacto ansiogénico de una IMO aguda.

3) En estudios con anfetamina puestos en marcha antes del inicio del presente proyecto, hemos realizado estudios de doble marcaje con c-fos y marcadores aminérgicos (tirosina hidroxilasa en el área tegmental ventral y triptófano-hidroxilasa tipo 2 en el núcleo dorsal del Rafe), obteniéndose (Rotllant et al. 2008b) que sólo un porcentaje muy pequeño de las neuronas activadas tras la anfetamina son de tipo dopaminérgico o serotoninérgico (respectivamente). También se han realizado estudios (Rotllant et al. 2008a) de doble marcaje (inmunohistoquímica) tras la administración de anfetamina, con el objetivo de investigar el fenotipo de las neuronas activadas, mediante la inmunodetección del neuropéptido formado por estas neuronas y de la expresión de c-fos. La administración de anfetamina aumenta el número de neuronas fos+ en los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular (PVN) del hipotálamo, así como en la amígdala central (CeA). En cuanto al fenotipo neuronal, la droga causa un incremento moderado de activación de las neuronas CRH+ del PVN, prácticamente nulo incremento de las neuronas vasopresina+ del SON o el PVN y un moderado incremento en las neuronas oxitocina+ del SON. Estos resultados nos indican que la anfetamina activa las distintas regiones funcionales del PVN y el SON y que la activación del eje HPA no se ejercería preferentemente a través de las neuronas de CRH, al contrario de lo que ocurre con la IMO (Rotllant et al., 2007).

Nuestro objetivo ha sido extender estos estudios con anfetamina a la cocaína. Inicialmente nos hemos centrado en el estudio de la inducción de c-fos en respuesta a la exposición simultánea a la IMO y a la cocaína respecto a la exposición separada a cada estímulo. Dentro de las áreas seleccionadas para el estudio, la mayoría responden, como era de esperar, a ambos estímulos (distintas regiones de la corteza prefrontal, amígdalas central y medial, núcleo accumbens, PVN), pero alguna responde exclusivamente a la cocaína (estriado dorsal). La combinación de ambos estímulos se tradujo en un patrón complejo, sin efecto sumatorio en la mayoría de los casos, efecto sumatorio en algunos (PVN) y sinergia negativa en otros. Esta sinergia negativa se observó sobre todo en el núcleo accumbens y en el del lecho de la estría terminal, sugiriendo que a en estas áreas la administración de cocaína podría interferir con algunos de los efectos del estrés.

4) Hemos estudiado los efectos de la interacción entre cocaína e IMO agudas sobre los niveles de hormonas periféricas del eje HPA y también sobre componentes centrales del eje HPA, incluyendo el CRF, el receptor tipo 1 del CRF y los receptores de corticosteroides tipo II (GR) en regiones del SNC importantes respecto al eje HPA o la acción del CRF. En este caso hemos utilizado disección y técnicas de PCR para analizar niveles de mRNA. A las 4 h de la administración de cocaína o 1 h de IMO, la droga no incrementó la expresión de CRF en el hipotálamo, pero la IMO sí lo hizo. En

cambio los dos estímulos incrementaron la expresión de CRF en la amígdala, sin efecto sumatorio con la combinación de los dos estímulos. Finalmente, la cocaína pero no le IMO incrementó la expresión de CRF en la corteza prefrontal. No se observó ningún efecto claro sobre el receptor CRF-1 en hipófisis o hipotálamo. Respecto a GR, no se observaron cambios en hipófisis, pero ambos estímulos descendieron la expresión de GR en hipotálamo, con un bloqueo del efecto por la combinación de ambos. No se observaron efectos en otras áreas como hipocampo, amígdala, estriado o núcleo accumbens.

Conclusiones generales

Las conclusiones generales del estudio son que la administración crónica previa de cocaína tiene poco efecto sobre la respuesta del eje HPA y los cambios conductuales causados por la exposición a un estímulo estresante de alta intensidad. Por el contrario, la administración simultánea de cocaína y estrés (IMO) sí da lugar a un número importante de interacciones, cuyo significado biológico está aún por caracterizar en profundidad. Entre los aspectos más notables de esta interacción se encuentran la sinergia negativa con la activación del eje HPA y con la inducción de c-fos en diversas áreas del SNC y, finalmente, la posible interacción con la adaptación al estrés.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR.

En Cerdanyola del Vallès, a 16 de Mayo de 2011

FIRMA

Antonio Armario

