



## RESUMEN FINAL PROYECTO INVESTIGACIÓN

**EXPEDIENTE: 2019I006**

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Mecanismos neurobiológicos subyacentes a la vulnerabilidad y la resiliencia a la adicción al cannabis

**INVESTIGADORA PRINCIPAL:** Elena Martín García

**EQUIPO DE INVESTIGACIÓN (nombre y apellidos del resto del equipo de investigación):**

Eric Senabre Marchan

Sami Kummer

Mireia Carcolé Estrada

**ENTIDAD BENEFICIARIA Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN:**

Universitat Pompeu Fabra (UPF)

Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB)

---

### **RESUMEN (1) (2):**

La pregunta que nos planteamos en el presente trabajo es estudiar las bases neurobiológicas de la adicción al cannabis mediante el uso de una técnica quimiogénica (también llamada diseño de receptores exclusivamente activados por drogas de diseño, DREADD), con un enfoque de vector dual (o enfoque retro-DREADD) que consiste en controlar, de forma selectiva, vías neuronales específicas en el cerebro. Una característica distintiva de la adicción es la conducta compulsiva, que se observa solo en una subpoblación de individuos. Sin embargo, los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la vulnerabilidad o resistencia al comportamiento de tipo compulsivo siguen siendo desconocidos. Se cree que la corteza prefrontal medial (mPFC) desempeña un papel crucial en el ciclo adictivo, ya que su función en el control inhibitorio queda alterada. Se ha postulado que el circuito neuronal que va desde el mPFC hasta el núcleo accumbens (NAc) tiene un papel principal en la vulnerabilidad y en la resiliencia para desarrollar un comportamiento adictivo. El objetivo específico de este trabajo es estudiar la participación de estas proyecciones glutamatérgicas en la pérdida de control sobre el consumo de cannabis mediante el uso del enfoque retro-DREADD para el control quimiogénico de este circuito específico. Con este fin, en el enfoque retro-DREADD expresaremos el DREADD inhibitor 'hM4Di' regulado por el promotor CamKII en el mPFC (región prelímbica, capa 5) de ratones WT y el virus adenoasociado (AAV) retrogrado que expresa Cre en el NAc Core.

---



---

Activaremos los receptores DREADD crónicamente con clozapina-N-óxido (CNO), usando minibombas implantadas a nivel subcutáneo, para producir hiperpolarización (producida por el DREADD inhibidor 'hM4Di') de las neuronas del circuito mencionado. También inhibimos este circuito al sobreexpresar el receptor de dopamina D2.

**ABSTRACT (English):**

The question posed in this project is to study the neurobiological bases of cannabis addiction by using a chemogenetic technique (also called designer drug-exclusively activated receptor design, DREADD), with a dual vector approach (or retro-DREADD approach) that consists of selectively controlling specific neural pathways in the brain. A hallmark of addiction is compulsive behavior, seen only in a subpopulation of individuals. However, the neurobiological mechanisms underlying vulnerability or resistance to compulsive-type behavior remain unknown. The medial prefrontal cortex (mPFC) is believed to play a crucial role in the addictive cycle, as its role in inhibitory control is impaired. Furthermore, the neural circuitry from the mPFC to the nucleus accumbens (NAc) has been postulated to play a major role in vulnerability and resilience to develop addictive behavior. The specific objective of this work is to study the participation of these glutamatergic projections in the loss of control over cannabis use by using the retro-DREADD approach for the chemogenetic control of this specific circuit. To this end, in the retro-DREADD approach, we expressed the inhibitory DREADD 'hM4Di' regulated by the CamKII promoter in the mPFC (prelimbic region, layer 5) of WT mice and the retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre in the NAc Core. We activated the DREADD receptors chronically with clozapine-N-oxide (CNO), using subcutaneously implanted minipumps, to produce hyperpolarization (produced by the DREADD inhibitor 'hM4Di') of the neurons of the aforementioned circuit. We also inhibited this circuit by overexpressing the dopamine D2 receptor.

**PALABRAS CLAVE (3):**

DREADDs, Cannabis, adicción, control inhibitorio, mPFC, NAc

**KEY WORDS (English):**

DREADDs, Cannabis, addiction, inhibitory control, mPFC, NAc

**JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO Y OBJETIVOS:**

**Objetivo 1. Validar el modelo animal de adicción al cannabis en ratones.**

Basándonos en el modelo de autoadministración de WIN 55,212-2 (Vallee et al., Science, 343(6166):94-8, 2014) y el de adicción a la comida (Mancino et al., Neuropsychopharmacology, 40:2788-2800, 2015) que hemos publicado recientemente, obtendremos dos subpoblaciones extremas de animales vulnerables o resilientes a la adicción al cannabis. Este modelo tiene validez aparente porque se basa en los criterios diagnósticos del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-5.

**Objetivo 2. Reducir la excitabilidad de las proyecciones glutamatérgicas del mPFC al NAc.**

Utilizaremos el enfoque retro-DREADD. Induciremos hiperpolarización de las proyecciones glutamatérgicas que van desde el mPFC al NAc utilizando una estrategia mediada por virus. Específicamente, el virus inhibidor DIO-DREADD (hM4Di) se inyectará en el área prelímbica del mPFC y un virus retrógrado que porta la enzima CRE se inyectará en el NAc. El

---



tratamiento crónico de los ratones que expresan DREADD con CNO reducirá la excitabilidad de las proyecciones glutamatérgicas que proyectan desde el mPFC a las neuronas del NAc provocando el comportamiento de tipo compulsivo.

**Objetivo 3. Estudiar los efectos de la exposición al THC durante la adolescencia.**

Se obtendrán fenotipos extremos en machos y hembras utilizando la manipulación quimiogenética de retro-DREADD. El umbral de vulnerabilidad y resiliencia será diferente en ambas poblaciones dependiendo del género. Además, un subgrupo de animales machos y hembras recibirá un tratamiento de THC durante la adolescencia que incrementará la vulnerabilidad al desarrollo de la conducta de adicción al cannabis.

**Objetivo 4. Determinar los niveles de expresión de los receptores D2 en el NAc.**

Se medirán los niveles de expresión de los receptores D2 en el NAc en animales con hipofunción del mPFC adictos al cannabis. Se espera encontrar una correlación positiva entre la hipofunción del mPFC y la regulación a la baja de los receptores D2 en el NAc.

**Objetivo 5. Sobre expresar los receptores D2 en la vía del mPFC al NAc.**

Se inducirá la sobreexpresión de los receptores D2 de la vía del mPFC al NAc mediante la inyección del virus AAVstop-D2 y el AAV-Retro-Cre para promover la vulnerabilidad al uso compulsivo de cannabis.

**METODOLOGÍA Y DESARROLLO DEL PROYECTO. ANALISIS ESTADÍSTICO:**

El presente proyecto se desarrolló en 5 fases que corresponden a los 5 objetivos del mismo. A continuación, se detallan el diseño experimental y la metodología con las fechas, el cronograma y la bibliografía correspondiente.

**Objetivo o fase 1. Validar el modelo animal de adicción al cannabis en ratones.**

**Animales**

Ratones macho C57BL/6J de ocho semanas de edad (n=30) (Charles River, Francia) se alojaron individualmente con alimento y agua disponibles ad libitum en condiciones controladas de laboratorio ( $21 \pm 1$  °C,  $55 \pm 10$  %). Los ratones se probaron durante las primeras horas de la fase oscura de un ciclo inverso de luz/oscuridad (luces apagadas a las 8:00 am y encendidas a las 20:00 pm). El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron durante todo el experimento. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité ético local (Comitè Ètic d'Experimentació Animal-Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, CEEA-PRBB, acuerdo N°9687) y se realizaron en estricta conformidad con las directrices de la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (2010). /63/EU) que regula la experimentación con animales, en el animalario del Parque de Investigación Biomédica de la Universitat Pompeu Fabra-Barcelona (UPF-PRBB; Barcelona, España). Todos los experimentos se realizaron en condiciones ciegas y aleatorias.

**Drogas**

WIN 55,212-2 [(R)-(+)-WIN 55,212-2 sal mesilato, Sigma-Aldrich, EE. UU.] se disolvió en una gota de Tween 80 (TWEEN 80, Sigma-Aldrich, EE. UU.) y luego se diluyó en heparina (solución salina estéril al 1 %) y disponible en dos dosis diferentes: 0,1 mg/kg para inyección intraperitoneal (ip) 24 h antes de la primera sesión operante y 12,5 µg/kg/infusión para las



infusiones iv autoadministradas. La preparación se cubrió de la luz y se almacenó a temperatura ambiente. Después de cada sesión de autoadministración, se aplicaron 0,05 ml de heparina sódica (Hospira 5 %, Hospira, Pfizer) a través del catéter iv para evitar la coagulación y obstrucción de este último. Se disolvió tiopental sódico (5 mg/ml, Braun Medical S.A.) en agua destilada y se inyectó un volumen de 0,05 ml a través del catéter iv para evaluar la permeabilidad del catéter.

#### **Aparato de autoadministración operante.**

Los experimentos se realizaron en cámaras operantes de ratón (modelo ENV-307A-CT, Med Associates Inc., Georgia, VT, EE. UU.) equipadas con dos agujeros, uno seleccionado al azar como orificio activo y el otro como orificio inactivo. Se ubicó una luz de la caja en el techo de la cámara y se colocaron dos luces de estímulo (señales), una dentro del orificio activo y la otra encima. Meter la nariz en el orificio activo resultó en la administración de una infusión de WIN 55,212-2 (según el programa asociado) junto con la activación de la luz de estímulo ubicada sobre el orificio activo, mientras que meter la nariz en el orificio inactivo no tuvo consecuencias. Las cámaras fueron hechas de aluminio y acrílico y colocadas dentro de cajas atenuadas de luz y sonido equipadas con ventiladores que proporcionan ventilación y ruido blanco. El suelo de la cámara era una rejilla hecha con barras de metal que podían conducir la corriente eléctrica al realizar la prueba de choque. WIN 55,212-2 (12,5 µl/kg/infusión) se administró en un volumen de 23,5 µl durante 2 s a través de una jeringa firmemente unida a una bomba de microinfusión (PHM-100A, Med-Associates, Georgia, VT, EE. UU.) y conectada con tubo de polímero flexible (0,96 mm de diámetro exterior, Portex Fine Bore Polythene Tubing, Portex Limited, Kent, England) a un eslabón giratorio de líquido de un solo canal (375/25, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, EE. UU.) y el catéter intravenoso de ratón.

#### **WIN 55,212-2 autoadministración**

##### **Cateterismo de la vena yugular:**

Se anestesiaron ratones (n=30) mediante inyección ip (0,2 ml/10 g de peso corporal) de clorhidrato de ketamina (75 mg/kg de peso corporal, Ketamidol, Richterpharma ag, Austria) y clorhidrato de medetomidina (1 mg/kg de peso corporal, Domtor, Esteve, España) disuelto en solución salina fisiológica estéril al 0,9 % y luego implantado con catéteres permanentes iv silastic en la vena yugular derecha, como se describió anteriormente (1), un tubo de silicona de 6 cm de largo (0,3 mm de diámetro interior, 0,6 mm diámetro exterior; Silastic, Dow Corning, Houdeng-Goegnies, Bélgica) se adaptó a una cánula de acero calibre 22 (Semat, Herts, Inglaterra) curvada en ángulo recto e incrustada en un disco de cemento dental (Dentalon Plus, Heraeus Kulzer, Alemania) con una malla de nailon debajo. El tubo del catéter se insertó 1,1 cm en la vena yugular derecha y se unió con una sutura. El tubo restante se insertó por vía subcutánea (sc) a la cánula, saliendo en la región medioescapular. Todas las incisiones fueron suturadas y recubiertas con analgésico local (Blastoestimulina, Almirall, España). El procedimiento postoperatorio consiste en una inyección ip de antibiótico (1 mg/kg de peso corporal, Gentamicina, Genta-Gobens, Laboratorios Normon, España), una inyección sc de analgésico (mezcla de glucosa en suero (GlucosaVet, B. Braun Vet Care, España) y meloxicam (2 mg/kg de peso corporal, Metacam, Boehringer Ingelheim, Rhein) y se aplicó una inyección sc de un reversor de anestesia, clorhidrato de atipamezol (2,5 mg/kg de peso corporal, Revertor, Virbac, España). Todas las preparaciones eran disueltas en solución salina fisiológica estéril al 0,9 %. Se permitió que



---

los ratones se recuperaran durante tres días, con analgésicos de seguimiento, antes del inicio de las sesiones de autoadministración. La permeabilidad de los catéteres intravenosos se evaluó mediante una prueba de tiopental sódico al final. El ratón se retiraba del experimento si no se observaban signos prominentes de anestesia inmediatamente después de la inyección (n=1 en este estudio).

#### **Entrenamiento de autoadministración WIN 55,212-2**

El modelo operante se aplicó de acuerdo con los paradigmas previos de autoadministración de fármacos(2, 3). Para evitar los efectos aversivos de la primera administración del fármaco, los ratones recibieron una inyección ip de WIN 55,212-2 (0,1 mg/kg) solo 24 h antes de la primera sesión de autoadministración. Posteriormente, los ratones (n=29) fueron entrenados para adquirir un condicionamiento de autoadministración operante mantenido por infusiones iv de WIN 55,212-2. El programa fue un programa de refuerzo de razón fija (FR) 1 durante 5 sesiones consecutivas, seguido de una progresión a FR2 durante otras 5 sesiones. Todas las sesiones se realizaron a la misma hora y se programaron todos los días. Cada sesión de autoadministración diaria se iniciaba con una inyección de cebado del fármaco (0,0125 mg/kg/infusión) entregada automáticamente por vía iv a través del catéter cuando se iniciaba la sesión, seguido de dos periodos activos de 55 min separados por un periodo libre de drogas de 15 min con una duración total de 125 min. El inicio de cada sesión se señaló encendiendo la luz de la casa solo durante los primeros 3 s. Las luces indicadoras, junto con el ruido de la bomba de infusión, actuaron como señales ambientales que señalaban la infusión del fármaco. Se fijó un período de tiempo de espera de 10 s después de cada administración de drogas, durante el cual la luz indicadora estaba apagada y no se proporcionó ninguna recompensa después de responder al toque de nariz activo. Se registraron las respuestas a los hoyos activos e inactivos y todas las respuestas ejecutadas durante el tiempo muerto. Durante el período libre de drogas, no se entregó ningún refuerzo ni señal, señalado por la activación de la luz de la casa. La sesión concluyó después de que se entregaron 50 refuerzos o después de 125 min, lo que ocurriera primero. La adquisición de la conducta de autoadministración se logró cuando se cumplieron las tres condiciones siguientes: 1) los ratones mantuvieron un 80 % de estabilidad en tres sesiones de entrenamiento consecutivas, lo que significa que la varianza durante estos tres días fue del 20 % o menos, 2) al menos 75 % respondiendo sobre el hoyo activo, y 3) un mínimo de cinco reforzadores por sesión. Después de cada sesión, los ratones fueron devueltos a sus jaulas de origen (Figura 1).

---

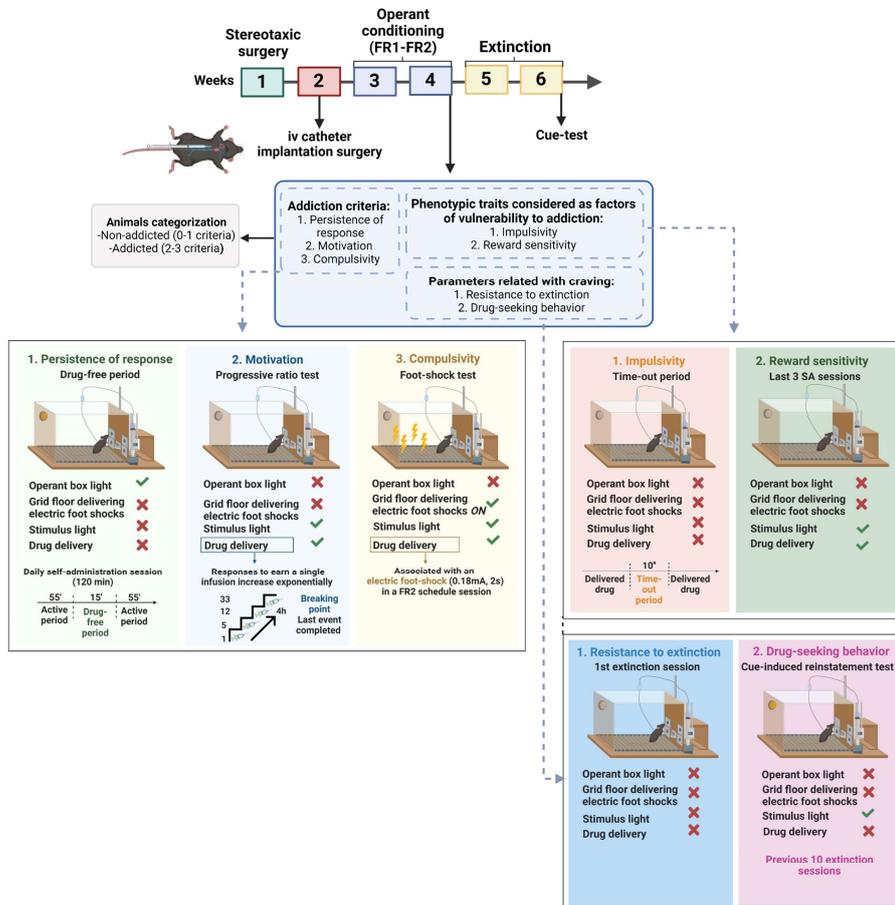


Figura 1. Protocolo experimental completo de nuestro modelo de ratón de autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 operante.

### Tres criterios de adicción

El desarrollo de conductas adictivas se evaluó al final de las sesiones de entrenamiento en base a tres criterios adictivos que resumen las características de la adicción según el DSM-5. La puntuación de la adicción desarrollada se atribuyó luego en base a los resultados de estos tres criterios, cada uno determinado por la prueba de comportamiento respectiva:

**(1) Persistencia de la respuesta:** el número de respuestas activas no reforzadas durante el período de 15 min sin drogas se midió como persistencia del comportamiento de búsqueda de drogas. Los ratones se puntuaron en los tres días consecutivos antes de la relación progresiva (PR).

**(2) Motivación:** El programa de refuerzo PR evaluó la motivación hacia el reforzador. Las respuestas requeridas para recibir una infusión de fármaco escalaron después de esta serie: 1, 5, 12, 21, 33, 51, 75, 90, 120, 155, 180, 225, 260, 300, 350, 410, 465, 540, 630, 730, 850, 1000, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000, 3400, 3800, 4200, 4600, 5000 y 5500. El punto de ruptura, el número máximo de respuestas que realizan los ratones para obtener una infusión definida como valor de motivación, corresponde al último ratio completado. La duración de la sesión de PR fue de un máximo de 4 h o hasta que los ratones dejaron de responder a cualquier golpe de nariz dentro de 1 h.

**(3) Compulsividad:** La resistencia al castigo, ahora definida como un comportamiento de



tipo compulsivo, correspondía al mantenimiento de un comportamiento de respuesta activa a pesar de su asociación con una consecuencia negativa. Se midió por el número total de descargas obtenidas en una prueba de descarga de 50 min, durante la cual cada droga administrada se asoció con un castigo inducido por descargas en los pies. Esta sesión de choque se realizó después de una sesión de autoadministración de FR2 estabilizadora después de la prueba de PR. Los ratones se colocaron en una caja operante diferente a la que se usa regularmente para las sesiones operantes. Luego, los ratones se sometieron a un programa de refuerzo de autoadministración de FR2 durante 50 minutos con dos cambios programados: después de una respuesta activa, los ratones recibieron una descarga eléctrica en las patas (0,18 mA, 2 s), mientras que después de la segunda respuesta, la descarga eléctrica en las patas se combinó con la administración del fármaco y la luz indicadora asociada. Paralelamente, si la segunda respuesta no se completaba dentro de un minuto después de completar la primera respuesta, se reiniciaba la secuencia.

#### **Establecimiento de subpoblaciones de ratones.**

Después de realizar las tres pruebas de comportamiento, los ratones se clasificaron en adictos y no adictos. Se clasifica a los animales en función del número de criterios positivos alcanzados. Se consideró que un ratón era positivo para un criterio similar a la adicción cuando la puntuación de la prueba de comportamiento era igual o superior al percentil 75 de la distribución normal del grupo de solución salina. Los ratones que alcanzaron 2 o 3 criterios se consideraron adictos y se clasificaron como vulnerables, mientras que los que alcanzaron 0 o 1 criterio se consideraron no adictos y se clasificaron como resistentes.

#### **Extinción y parámetros relacionados con el craving**

Solo los ratones con catéteres permeables que alcanzaron todos los criterios de adquisición continuaron hasta la fase de extinción. Después de la prueba con tiopental, se permitió que los ratones descansaran durante un día, durante el cual se sometieron a una prueba de locomoción de 2 h en cajas de actividad locomotora individuales (10,8 × 20,3 × 18,6 cm, Imetronic, Pessac, Francia) equipadas con sensores infrarrojos para detectar actividad locomotora y un plano infrarrojo para detectar crías.

Durante el período de extinción, no se administraron infusiones de WIN 55,212-2, ni las señales ambientales asociadas después de hacer la respuesta en el orificio activo. Los ratones fueron expuestos a sesiones diarias de 2 h durante 10 días consecutivos en la misma cámara operante que las sesiones de autoadministración. Durante este período, los ratones alcanzaron el criterio de extinción cuando las respuestas al toque de nariz activo fueron < 35 % de las respuestas medias obtenidas durante los últimos tres días de autoadministración de WIN 55,212-2 en tres sesiones de extinción consecutivas. Solo los ratones que lograron el criterio de extinción se evaluaron para lo siguiente. Se evaluaron dos parámetros relacionados con el craving antes y después de este período de extinción:

***Resistencia a la extinción.*** Número de respuestas activas en 2 h durante la primera sesión de extinción. Los animales con una sensibilidad significativa a la abstinencia de drogas aumentarán su resistencia a la extinción al aumentar el número de respuestas activas para buscar la droga cuando se impide el acceso.

***Conducta de búsqueda de drogas.*** El día después de alcanzar el criterio de extinción, realizamos una única sesión de recaída inducida por señal en la misma cámara operante, para probar la recaída del comportamiento de búsqueda de drogas tras la exposición a los estímulos ambientales después de un período de abstinencia. La prueba de la señal se



realizó en las mismas condiciones utilizadas en la fase de adquisición, excepto que la respuesta activa no fue reforzada por la droga. Esto significó que los ratones se sometieron a una sesión de FR2 de 90 minutos, donde los primeros 60 minutos fueron similares a una sesión de extinción, pero en los últimos 30 minutos, dar una respuesta activa resultó en la presentación de todas las señales ambientales asociadas (luz de señal, ruido de bomba y luz de inyección de cebado) pero no la entrega de WIN 55,212-2.

#### **Pruebas de comportamiento para evaluar rasgos fenotípicos similares a la adicción**

También se evaluaron dos rasgos fenotípicos adicionales como factores de vulnerabilidad a la adicción:

**Impulsividad.** El número de respuestas activas no reforzadas durante los períodos de espera (10 s) después de cada entrega de WIN 55,212-2 se midió como un comportamiento similar a la impulsividad, que indicaba la incapacidad de detener una respuesta una vez iniciada. Para este criterio se consideraron los tres días consecutivos previos a la prueba de PR.

**Sensibilidad a la recompensa.** El número de reforzadores obtenidos en sesiones de 2 h durante las últimas tres sesiones consecutivas de condicionamiento operante FR2 mantenidas por WIN 55,212-2. Los animales con mayor sensibilidad a la recompensa obtendrán un mayor número de reforzadores.

#### **Objetivo o fase 2. Reducir la excitabilidad de las proyecciones glutamatérgicas del mPFC al NAc.**

##### **Enfoque DREADD: cirugía y microinyección de vectores virales**

Los vectores virales adenoasociados (AAV) utilizados fueron: AAV-hM4Di-DREADD (AAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry,  $1.21E+13$  gc/ml) y AAV-retrograde-Cre-EBFP (AAV pmSyn1 - EBFP-Cre;  $8,2E+12$  gc/ml) (Unidad de Producción de Vectores Virales, Universitat Autònoma de Barcelona).

Los ratones se anestesiaron mediante inyección ip (0,2 ml/10 g de peso corporal) de clorhidrato de ketamina (75 mg/kg de peso corporal, Ketamidol, Richterpharma ag, Austria) y clorhidrato de medetomidina (1 mg/kg de peso corporal, Domtor, Esteve, España) disueltos en solución salina fisiológica estéril al 0,9 % y colocado en un aparato estereotáxico para recibir las inyecciones intracraneales de AAV. Todas las inyecciones se realizaron a través de una cánula de inyección bilateral (cánula interna de calibre 33, Plastics One, Reino Unido) conectada mediante un tubo de polietileno (PE-20, Plastics One, Reino Unido) a una microjeringa de 10  $\mu$ l (Modelo 1701 N SYR, NDL cementado, 26s GA, 2 en punto estilo 3, Hamilton company, NV). Se utilizó el desplazamiento de una burbuja de aire a lo largo del tubo que conecta la jeringa con la aguja de inyección para controlar las microinyecciones. Para la inhibición precisa de la vía PL-NAc, se realizaron dos inyecciones bilaterales, una dirigida al PL y la otra al núcleo de NAc. A los ratones se les inyectaron 0,2  $\mu$ l por sitio de AAV-hM4Di-DREADD en PL (tasa de infusión de 0,05  $\mu$ l/min) y 0,4  $\mu$ l por sitio de AAV-retrograde-Cre-EBFP en el núcleo de NAc (tasa de infusión de 0,10  $\mu$ l/min). Después de la infusión, la cánula de inyección se dejó intacta durante 10 minutos adicionales para permitir que el líquido se difundiera y evitar el reflujo, y luego se retiró lentamente. Se utilizó una almohadilla térmica para conservar la temperatura corporal a 35<sup>o</sup> C. Las coordenadas utilizadas siguieron el atlas de Paxinos y Franklin (4): (PL) AP +2,10 mm, L  $\pm$ 0,3 mm, DV -2,3 mm; (núcleo NAc) AP +1,94 mm, L  $\pm$ 1 mm, DV -4,6 mm.

El N-óxido de clozapina (CNO, Enzo Life Sciences, NY), un fármaco conductualmente inerte,



se administró a través de minibombas osmóticas Alzet (Modelo 2004, Alzet, Cupertino, CA) previamente llenas con CNO (diluido en solución salina estéril al 0,9 %; 5 mg/mL) o solución salina fisiológica. Se implantaron minibombas sc en la parte inferior de la espalda de cada ratón durante la cirugía de cateterismo de la vena yugular. Las minibombas osmóticas suministraron CNO por ósmosis a un caudal sc constante de 0,25 µl/h durante 15 días (5, 6).

### **Objetivo o fase 3. Efectos del THC durante la adolescencia en la adicción al cannabis.**

Los ratones adolescentes recibieron una dosis diaria de 5 mg/kg de THC o vehículo desde el DPN 37 hasta el DPN 57. Posteriormente, se les implantó un catéter intrayugular para realizar la administración del fármaco por vía iv. Posteriormente, los ratones fueron entrenados para adquirir un condicionamiento de autoadministración del fármaco operante mantenido por infusiones iv de WIN 55,212-2 bajo un programa de refuerzo de proporción fija (FR) 1 durante 5 sesiones, seguido de 5 sesiones de un programa de refuerzo FR2. Después del entrenamiento, se consideraron factores tres criterios similares a la adicción que se asemejan a los criterios del DSM-5 para la adicción, la persistencia de la respuesta, la motivación y el comportamiento compulsivo, dos parámetros relacionados con el ansia, la resistencia a la extinción y el comportamiento de búsqueda de drogas, y dos rasgos fenotípicos. de vulnerabilidad al abuso de sustancias, impulsividad y sensibilidad a la recompensa, se evaluaron en cada ratón (Figura 1).

### **Tratamiento de THC para adolescentes**

Evaluamos el efecto a largo plazo de la exposición al THC durante la adolescencia en la autoadministración de WIN 55,212-2, el restablecimiento, los criterios similares a la adicción y los rasgos fenotípicos presentes en la edad adulta. Los ratones se dividieron en dos grupos y se les administró diariamente THC (n=20) o su vehículo (n=20) a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal desde el DPN 37 hasta el DPN 57, correspondiente al período adolescente en ratones según sobre literatura previa (7). Esta dosis de THC se eligió según estudios previos utilizando dosis similares para traducir en roedores las dosis utilizadas para fumar cannabis en humanos (7). El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron estrictamente durante todo el período de tratamiento. Posteriormente, los animales fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos, y una vez alcanzada la edad adulta (PND 68), se iniciaron experimentos de autoadministración.

### **Objetivo o fase 4. Determinar los niveles de expresión de los receptores D2 en el NAc.**

#### **Análisis de expresión génica y preparación de tejidos**

La recolección de tejido se realizó inmediatamente después de la prueba de reincorporación inducida por señales. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después, se extrajeron los cerebros del cráneo y se procesaron rápidamente en hielo. La corteza prefrontal medial (mPFC), el núcleo accumbens (NAc), el estriado dorsal (DS) y el hipocampo (HPC) se aislaron de acuerdo con las siguientes coordenadas del atlas de Paxinos y Franklin: (mPFC) AP +1,98 mm; (NAc) AP +1,94 mm; (DS) AP +0,62 mm; (HPC) AP -2,92 mm. Las muestras se colocaron en tubos individuales, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta el aislamiento del ARN. Las partes restantes del cerebro de los mismos animales también se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C.

#### **Extracción de ARN**



Los ARN totales de mPFC, NAc, DS y HPC se extrajeron con Trizol™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) para su posterior análisis por RT-PCR. Brevemente, los tejidos se homogeneizaron en reactivo trizol y, tras añadir cloroformo, se recogió la fase acuosa y se incubó en isopropanol para aislar el ARN. Mientras tanto, las muestras se mantuvieron en hielo seco para garantizar su integridad. A continuación, los tubos se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron en etanol al 75 % antes de otra centrifugación. Los sobrenadantes se descartaron cuidadosamente para secar al aire el sedimento durante al menos 2 h. Finalmente, los sedimentos se resuspendieron en agua libre de ARNasa, se incubaron durante 15 min a 55-60 °C y se almacenaron a -80 °C. Las concentraciones de ARN se cuantificaron mediante Nanodrop (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

### **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

La conversión cuantitativa del ARN extraído en ADN complementario monocatenario (ADNc) se realizó utilizando cebadores aleatorios incluidos en el kit de transcripción inversa (RT) de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, 4390778, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El análisis de PCR en tiempo real se llevó a cabo con los siguientes cebadores (Sigma-Aldrich, EE. UU.): drd1: directo "AGATTGACCAGGAAGAGGCC", inverso "GCAATCCAAGCCATACCAGG"; drd2: reenviar "CCATCTCTTGCCCACTGCTCTTTGG", revertir "GGTGACGATGAAGGGCAGTAGAAC"; adora2a: adelante "CGTCACCAACTTCTTCGTGG", atrás "GCTGAAGATGGAAGTCTGCG"; cnr1: avance "CCTGGGAAGTGTCATCTTTGT", retroceso "GGTAACCCACCCAGTTTGA". Estos cebadores se utilizaron en combinación con el kit PowerSYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los ensayos se analizaron con el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La expresión relativa de los ARNm se determinó después de la normalización con un gen de mantenimiento utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ . Todos los genes expresados diferencialmente validados se normalizaron usando  $\beta$ -actina. La expresión génica de  $\beta$ -actina se midió como gen doméstico en estas muestras utilizando qPCR para verificar que la expresión de estos genes no se vio afectada por el modelo operante utilizado.

### **Objetivo o fase 5. Sobre expresar los receptores D2 en la vía del mPFC al NAc.**

Realizamos la sobreexpresión de D2R en la vía central de PL-NAc, los ratones siguieron el mismo procedimiento quirúrgico y de comportamiento con un enfoque de doble vector similar al descrito en el experimento anterior con ligeras modificaciones: (1) AAV-D2R o AAV- control se inyectó en el PL, (2) no se requirió la intervención quirúrgica para la minibomba osmótica llena de CNO, y (3) se realizó un ensayo de inmunofluorescencia después de la perfusión de los ratones usando un anticuerpo anti-D2R y anti-GFP que visualice los D2R sobreexpresados y el reportero mVenus del AAV inyectado en PL y contra la recombinasa Cre para visualizar el sitio de inyección del AAV retrógrado en el núcleo de NAc y el transporte retrógrado al PL.

**Análisis de datos.** La distribución normal de los datos se verificará con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para confirmar que todas las variables siguen una distribución gaussiana, como se ha observado actualmente en estudios neuroquímicos y conductuales similares realizados previamente en nuestro grupo. Una vez confirmada la distribución gaussiana, se realizará el análisis de varianza (ANOVA de una vía para datos neuroquímicos y conductuales, ANOVA bidireccional o tridireccional de medidas repetidas



para datos de comportamiento operante) seguido de análisis post hoc (Newman-Keus) solo cuando el efecto principal del ANOVA (ANOVA de una vía) o las interacciones entre las variables principales (ANOVA de dos y tres vías) son significativas. La correlación entre los datos conductuales y neuroquímicos se realizará mediante el análisis de correlación de Pearson. Las diferencias se considerarán significativas a  $p < 0.05$ . Se utilizará el software SPSS versión 15.0. Se ha realizado un análisis de potencia para las condiciones experimentales que muestran la mayor variabilidad tanto en los estudios de comportamiento para evaluar el comportamiento operante como en las mediciones neuroquímicas posteriores. Para este propósito, realizamos estudios exploratorios con un tamaño de grupos pequeños para determinar la varianza experimental y el tamaño del efecto. El tamaño de grupo requerido se calculó utilizando el paquete de software Power and Precision (Biostat Inc, EE. UU.). El resultado fue un número de 12 ratones por grupo para el análisis sobre el comportamiento operante y 7 ratones por grupo para las mediciones neuroquímicas.

#### **PRINCIPALES RESULTADOS:**

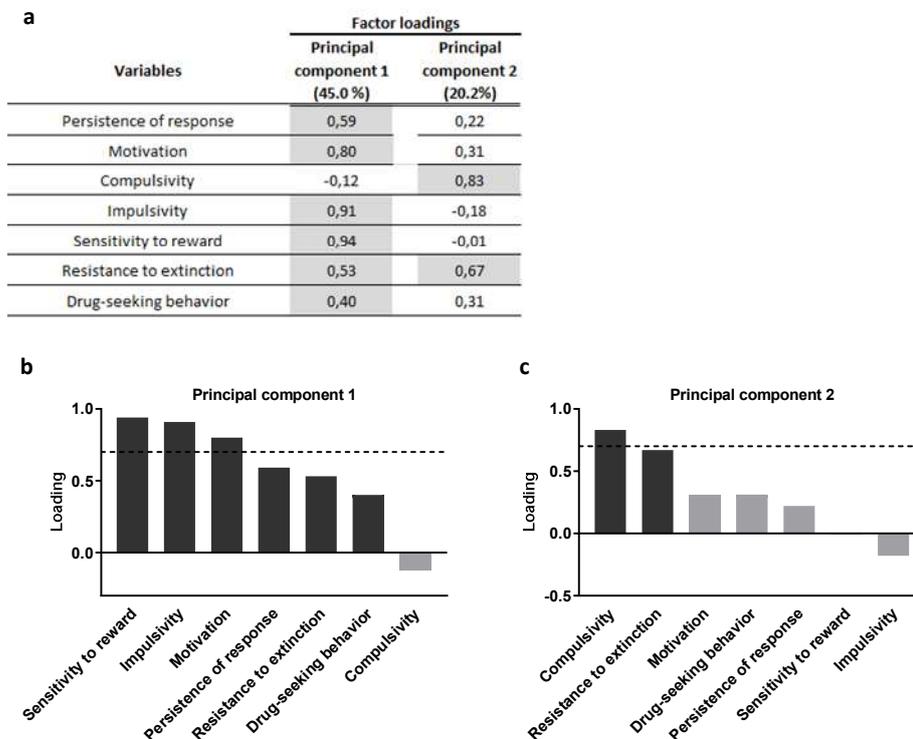
##### **Objetivo o fase 1. Validar el modelo animal de adicción al cannabis en ratones.**

##### **La autoadministración de WIN 55,212-2 condujo al desarrollo de un fenotipo adictivo en ratones.**

Hemos desarrollado por primera vez un modelo de ratón de adicción a los cannabinoides utilizando la autoadministración de WIN 55,212-2. Además, hemos evaluado en este modelo la posible implicación de la vía PL-NAC en el desarrollo de esta conducta adictiva (Figura 1).

##### **Análisis de componentes principales de la adicción a los cannabinoides mediante la autoadministración de WIN 55,212-2.**

Se utilizó un análisis de componentes principales para determinar si los resultados conductuales descritos anteriormente podrían reducirse a menos dimensiones que pudieran mostrar diferencias individuales en la adicción a los cannabinoides. Se tuvieron en cuenta todos los criterios de adicción, parámetros relacionados con el craving y rasgos fenotípicos. El componente principal 1, que representa el 45,0 % de la varianza (Figura 4a), tiene fuertes cargas ( $>0,7$ ) de todas las variables de comportamiento excepto la compulsividad. Estos rasgos están asociados al desarrollo de la adicción a los cannabinoides y, por tanto, contribuyen a este desarrollo. El segundo componente principal, que es ortogonal al componente 1 y explica el 20,2 % de la varianza, está compuesto por dos variables, los criterios de compulsividad y resistencia a la extinción. Curiosamente, la impulsividad participa más en el primer componente, mientras que la compulsividad es más crítica en el segundo componente (Figura 2), asemejándose a la característica secuencial de la transición de impulsividad a compulsividad descrita en la adicción. Finalmente, la mayoría de los rasgos fenotípicos de vulnerabilidad están en el mismo componente, lo que sugiere correlatos neurológicos similares.



**Figura 2. Análisis de componentes principales de la adicción a cannabinoides a través de la autoadministración operante de WIN 55,212-2. a. Cargas factoriales del componente principal 1 (PC1) y del componente principal 2 (PC2) en todas las variables estudiadas. A-c. Orden de carga factorial de las distintas variables en PC1 y PC2. La línea horizontal discontinua marca una carga superior a 0,7, lo que contribuye principalmente al componente. En cuanto a los criterios de adicción, se puede observar una disociación entre la motivación y la persistencia de la respuesta, que contribuye principalmente a PC1, y la compulsividad, que contribuye principalmente a PC2. En cuanto a los parámetros relacionados con el craving, la conducta de búsqueda de droga pesó más en el PC1, mientras que la resistencia a la extinción pesó más en el PC2, aunque su influencia también está presente en el PC1. Para los rasgos fenotípicos, ambos pesaron más en el PC1.**

### **Mapa de calor de correlación de las variables de criterio de adicción a cannabinoides, parámetros relacionados con el craving y rasgos fenotípicos de vulnerabilidad.**

Al representar los criterios similares a la adicción, los parámetros relacionados con el craving y los rasgos fenotípicos en un mapa de calor, los animales no adictos revelaron correlaciones significativas entre la persistencia de la respuesta y la sensibilidad a la recompensa ( $r=0,54$ ,  $p<0,01$ ), la motivación y la sensibilidad a la recompensa ( $r=0,62$ ,  $p<0,001$ ), la impulsividad y la sensibilidad a la recompensa ( $r=0,86$ ,  $p<0,001$ ) y la motivación y la impulsividad fueron significativas ( $r=0,54$ ,  $p<0,01$ ) (Figura 3a). En animales adictos, las correlaciones significativas entre motivación e impulsividad ( $r=0,99$ ,  $p<0,01$ ), motivación y sensibilidad a la recompensa ( $r=0,95$ ,  $p<0,05$ ) e impulsividad y sensibilidad a la recompensa ( $r=0,98$ ,  $p<0,01$ ) se mantuvieron (Figura 3b). Estos resultados estuvieron de acuerdo con los resultados obtenidos en el PCA. Curiosamente, compulsividad e impulsividad mostraron una correlación negativa (no significativa) en coherencia con la carga diferencial de cada variable en el PCA.

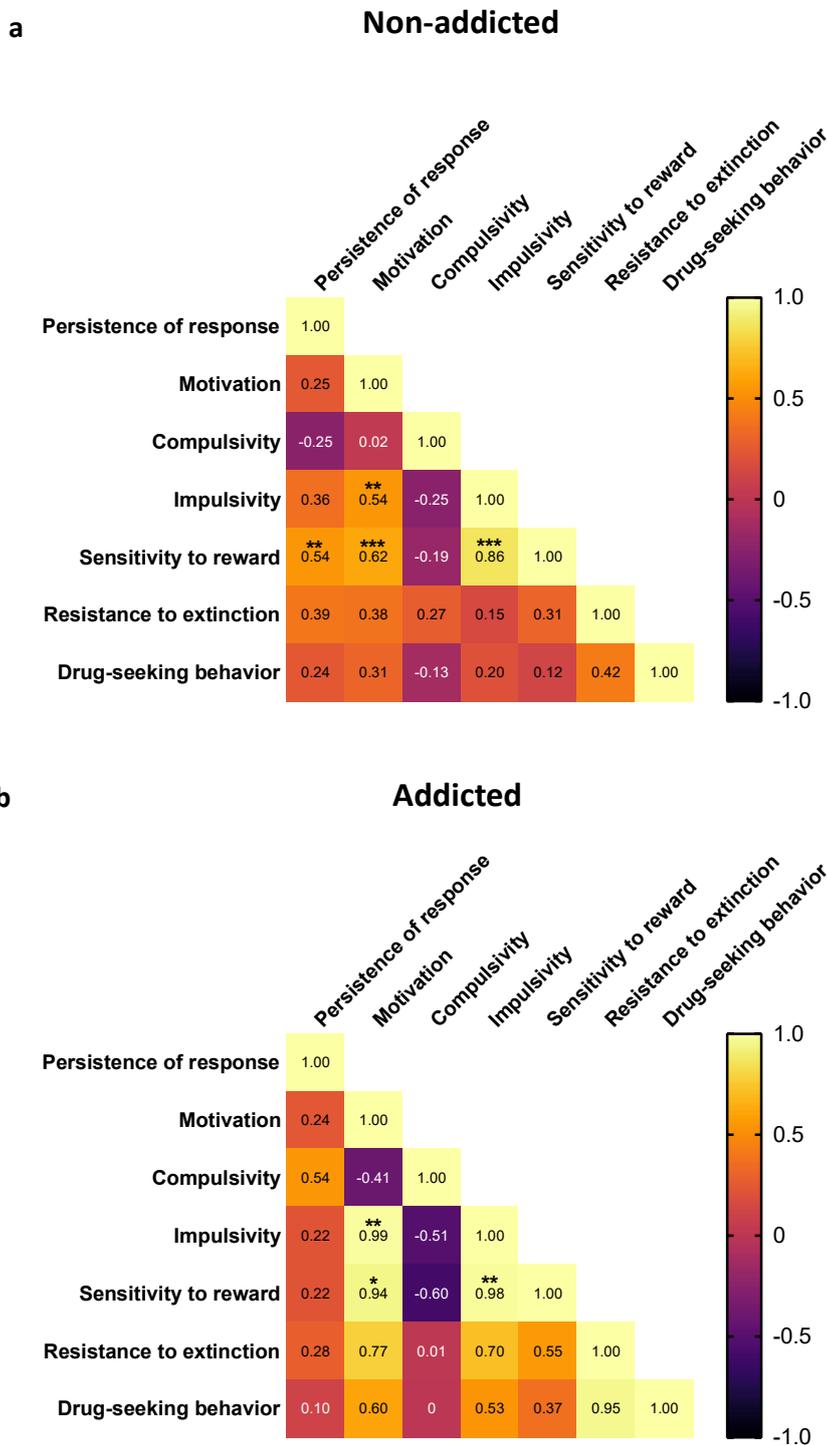


Figura 3. Mapas de calor de correlación de las variables de criterio de adicción a cannabinoides, parámetros relacionados con el craving y rasgos de vulnerabilidad fenotípica. a-b. Correlaciones de Pearson entre los tres criterios de adicción, los parámetros relacionados con el craving y los dos rasgos fenotípicos en ambos a. no adicto y b. grupos de adictos. (\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).

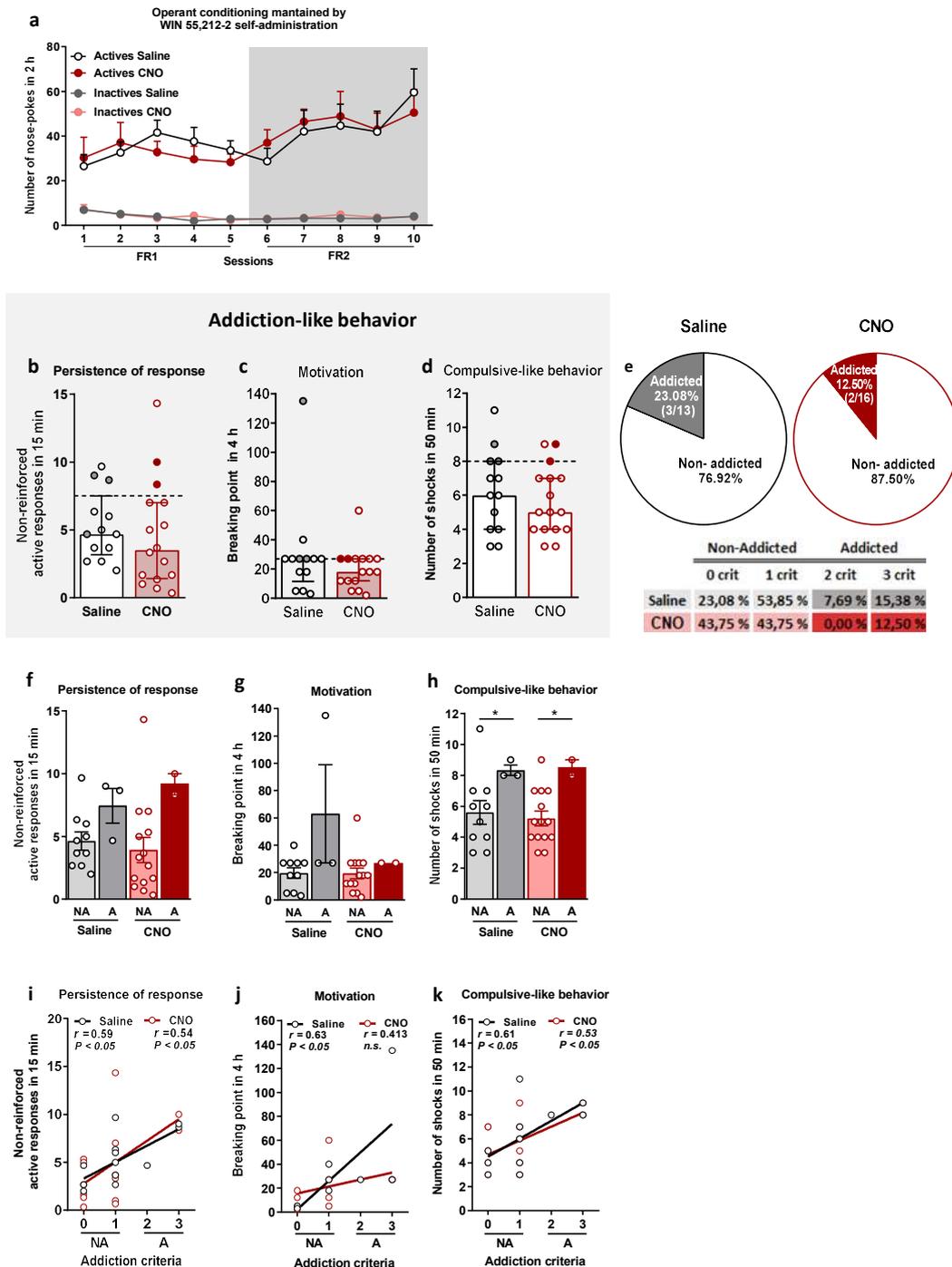
**Objetivo o fase 2. Reducir la excitabilidad de las proyecciones glutamatérgicas del mPFC al NAc.**



Los ratones tratados con solución salina y CNO fueron entrenados para adquirir una autoadministración operante sostenida por infusiones iv de WIN 55,212-2 (Figura 4a). El porcentaje de animales que cumplieron los criterios de adquisición de estabilidad, discriminación y número de reforzadores fue del 44,83 % en el grupo salino y del 55,17 % en el grupo CNO (chi-cuadrado, C-S=0,69, n.s.), con un aumento progresivo del número de respuestas activas entre sesiones (medidas repetidas ANOVA,  $[F(1,54)=27,76$  en FR1,  $F(1,54)=0,01$  en FR2,  $p<0,001$ , DMS activos frente a inactivos:  $p<0,001$  ). No se encontraron diferencias significativas en las respuestas activas e inactivas entre los ratones tratados con CNO y solución salina en los programas FR1 y FR2, lo que sugiere niveles similares de condicionamiento operante mantenidos por WIN 55,212-2 (DMS Activos/Inactivos CNO vs. Activos/Inactivos Solución salina: n.s.).

La puntuación de adicción se calculó después del entrenamiento operante utilizando los tres criterios similares a la adicción, como se explicó anteriormente. Se revelaron subpoblaciones extremas de ratones que presentan una alta persistencia de respuesta, motivación y compulsividad, tanto en el grupo de solución salina como en el de CNO. En concreto, el 26,1 % (23,08 % solución salina, 18,75 % CNO), el 51,7 % (61,54 % solución salina, 43,75 % CNO) y el 24,1 % (30,77 % solución salina, 18,75 % CNO) de los ratones superaron el umbral de cada criterio, lo que sugiere el desarrollo potencial de adicciones.

No se encontraron diferencias significativas entre los ratones tratados con CNO y solución salina en la persistencia de la respuesta, la motivación o el comportamiento compulsivo (Figura 4b-d). En el grupo de solución salina, el 23,08 % (3/13) se consideró adicto mientras que el 12,50 % (2/16) se consideró adicto en el grupo CNO (chi-cuadrado = 3,77, n.s., Figura 2e). Los ratones adictos mostraron una fuerte tendencia a una mayor persistencia de la respuesta en comparación con los no adictos en los grupos de solución salina y CNO y solo para los animales tratados con solución salina en la motivación (Figura 4f-g), mientras que se observó un comportamiento compulsivo significativamente mayor. para ratones adictos en comparación con ratones no adictos, independientemente del tratamiento (prueba U Mann-Whitney,  $U = 3000$  para NA frente a solución salina A y  $U = 1500$  para NA frente a A CNO,  $p < 0,05$ , Figura 4h), además, Se encontraron correlaciones positivas entre el número de criterios alcanzados y la gravedad de cada criterio en ratones tratados con CNO y solución salina para todos los criterios de tipo adictivo excepto para la motivación en ratones tratados con CNO (correlaciones de Pearson,  $p < 0,05$ , Figura 4i- k).



**Figura 4.** La autoadministración operante de WIN 55,212-2 condujo al desarrollo de un fenotipo adictivo en ratones. a. Número similar de respuestas activas e inactivas totales realizadas por los grupos tratados con CNO y solución salina durante 2 h de autoadministración operante mantenida por infusiones intravenosas de WIN 55,212-2 en los programas de refuerzo FR1 y FR2 (media  $\pm$  SEM, repetido mide ANOVA). b-d. Los ratones presentan respuestas similares en las tres pruebas de criterios similares a la adicción (datos individuales con mediana y rango intercuartílico): b. Persistencia de la respuesta: número de respuestas activas durante el período de 15 minutos sin drogas (prueba t de Student). C. Motivación: El punto de ruptura determinado durante un programa progresivo de refuerzo de 4 h representa el número máximo de respuestas que un animal es capaz de hacer para obtener una infusión de fármaco (U Mann-Whitney). d. Compulsividad: Número de descargas recibidas, reflejando el nivel de compulsividad de cada grupo (prueba t de Student). La línea horizontal discontinua indica el percentil 75 de la distribución del grupo, utilizado como umbral para considerar un ratón positivo para un criterio. Los ratones



---

adictos están representados en círculos grises y rojos. e. Porcentaje de ratones categorizados como adictos (Chi cuadrado). f-h. Pruebas de comportamiento de los tres criterios similares a la adicción que muestran una mayor compulsividad en ratones adictos en comparación con los no adictos pero con una persistencia similar en la respuesta y la motivación (datos individuales con media  $\pm$  SEM, U Mann-Whitney, \* P <0.05). i-k. Correlaciones de Pearson entre los valores individuales de los criterios similares a la adicción y i. respuestas activas no reforzadas en 15 min, j. punto de ruptura en 4 h y k. número de descargas en 50 min. (Ratones tratados con solución salina: n = 13; ratones tratados con CNO: n = 16; los detalles estadísticos se incluyen en la Tabla complementaria S1).

Después del entrenamiento con FR1 y FR2, los ratones se sometieron a 10 sesiones de extinción (Figura 5a). Ambos grupos extinguieron el comportamiento de autoadministración de manera similar (medidas repetidas ANOVA, [presiones de palanca activas: F (1,27) = 0,15, n.s., presiones de palanca inactivas: F (1,27) = 0,38, n.s.]), a pesar de una mayor número de reforzadores obtenidos durante la primera sesión en ratones tratados con solución salina en comparación con el grupo CNO (prueba U Mann-Whitney, U = 42, 000, p <0.01, Figura 5b). Las respuestas al agujero activo disminuyeron con el tiempo hasta alcanzar una disminución del 58 % y del 43,7 % de la respuesta activa en la última sesión en comparación con la última sesión operante para los grupos de solución salina y CNO, respectivamente.

Los animales que respondieron < 35 % de las respuestas medias realizadas durante los últimos tres días de autoadministración de WIN 55,212-2 en tres sesiones de extinción consecutivas adquirieron los criterios de extinción (30,77 % de solución salina y 12,50 % de ratones CNO, chi-cuadrado = 1,92 , n.s.). La resistencia a la extinción, medida el primer día de la extinción, fue significativamente menor en el grupo CNO en comparación con los ratones tratados con solución salina (prueba U Mann-Whitney, U = 42,000, p <0,01, Figura 5b). Por el contrario, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos para el restablecimiento del comportamiento de búsqueda de drogas inducido por señales (Figura 5c). Los ratones no adictos en el grupo de solución salina mostraron niveles más altos de respuesta en la primera sesión de extinción en comparación con los ratones no adictos en el grupo CNO (prueba U Mann-Whitney, U = 32.000, p <0.05, Figura 5d), mientras que no hubo cambios significativos. Se obtuvieron diferencias para el comportamiento de búsqueda de drogas (Figura 5e).

---

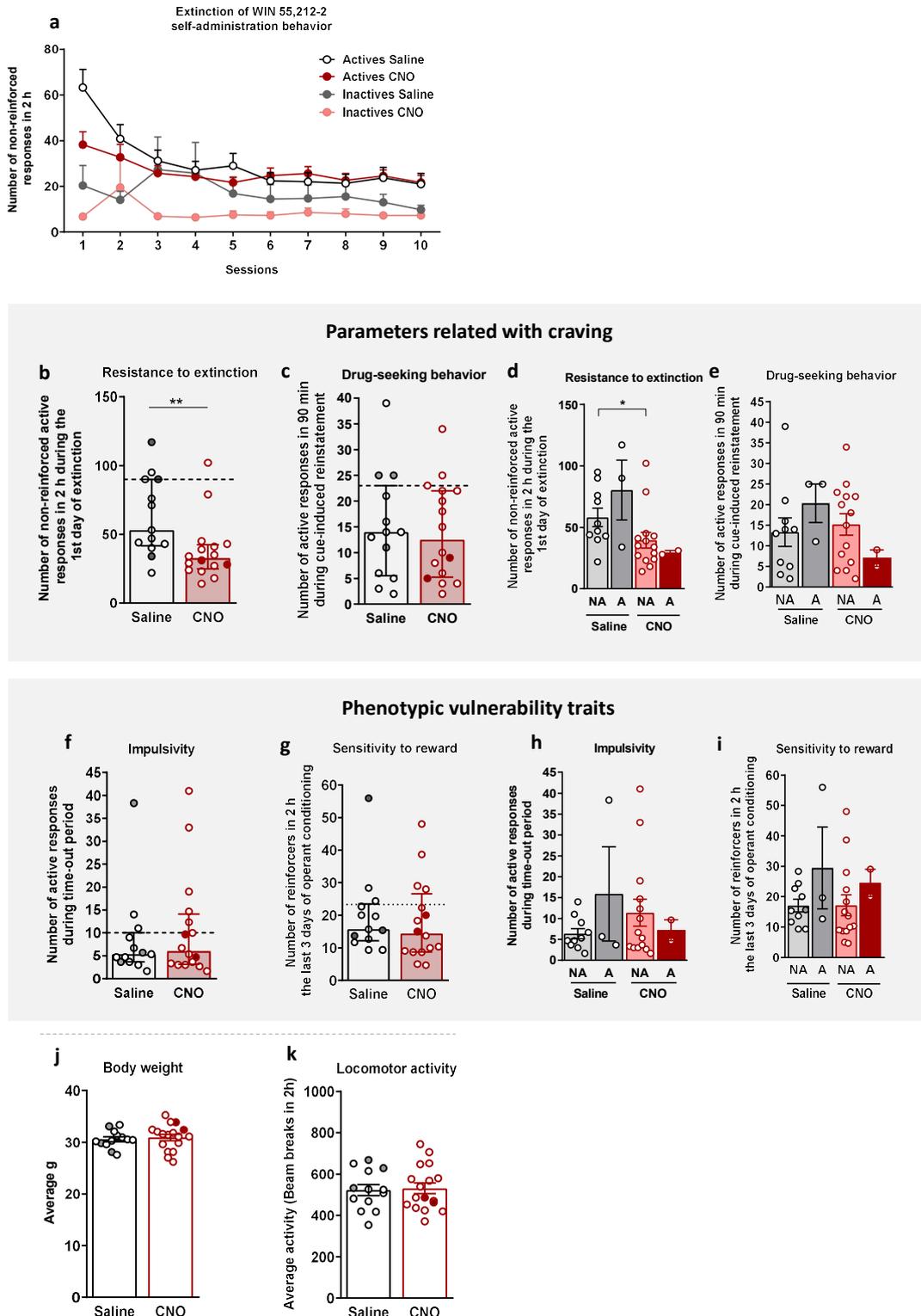


Figura 5. Efectos de la autoadministración operante de WIN 55,212-2 en dos parámetros relacionados con el ansia y dos rasgos de vulnerabilidad fenotípica al comportamiento similar a la adicción en ratones. a. Patrón de extinción del comportamiento de autoadministración operante de WIN 55,212-2 (media  $\pm$  S.E.M., ANOVA de medidas repetidas) a-c. Pruebas de comportamiento de los dos parámetros relacionados con el craving (datos individuales con mediana y rango intercuartílico): b. Resistencia a la extinción: el número de respuestas al activo durante la primera sesión de extinción de 2



horas es significativamente mayor en los ratones tratados con solución salina que en los tratados con CNO (U Mann-Whitney,  $**P<0,01$ ). c. Comportamiento de búsqueda de drogas medido por el restablecimiento inducido por señales después de la abstinencia: número de respuestas activas realizadas durante la prueba de búsqueda de drogas inducida por señales de 90 minutos realizada después de la extinción (prueba t de Student). La línea horizontal discontinua indica el percentil 75 de distribución del grupo, utilizado como umbral para considerar un ratón positivo para un criterio. Los ratones adictos están representados en círculos grises y rojos. d-e. Las pruebas de comportamiento de los parámetros relacionados con el craving muestran respuestas similares en el restablecimiento inducido por cue entre ratones adictos y no adictos (U Mann-Whitney), mientras que se observa una diferencia entre ratones no adictos en el primer día de extinción (U Mann-Whitney). Whitney,  $*P<0,05$ ) (datos individuales con media  $\pm$  S.E.M.). f-g. Pruebas conductuales utilizadas para evaluar los rasgos fenotípicos considerados factores de vulnerabilidad a la conducta adictiva (datos individuales con mediana y rango intercuartílico): f. Impulsividad: número de respuestas activas durante el período de espera de 10 s (U Mann-Whitney) g. Sensibilidad a la recompensa: Número de reforzadores realizados al agujero activo durante las 2 h de las últimas tres sesiones de autoadministración (test t de Student). La línea horizontal discontinua indica el percentil 75 de distribución del grupo, utilizado como umbral para considerar un ratón positivo para un criterio. Los ratones adictos están representados en círculos grises y rojos. h. Pruebas de comportamiento de los rasgos fenotípicos que muestran respuestas similares en impulsividad y comportamiento durante los últimos tres días de entrenamiento operante entre ratones adictos y no adictos (U Mann-Whitney) (datos individuales con media  $\pm$  S.E.M.). j. Peso corporal: el peso corporal se midió cada semana durante el protocolo de autoadministración (media  $\pm$  S.E.M.; prueba t de Student). k. Actividad locomotora: la actividad se midió por el número de roturas del haz durante una prueba de 2 h (media  $\pm$  SEM; prueba t de Student). (Ratones tratados con solución salina: n = 13; ratones tratados con CNO: n = 16).

### **Efectos de la autoadministración de WIN 55,212-2 en los rasgos de vulnerabilidad fenotípica al comportamiento similar a la adicción en ratones.**

También se evaluaron dos rasgos fenotípicos considerados como factores de vulnerabilidad al comportamiento adictivo, la impulsividad y la sensibilidad a la recompensa. No se encontraron diferencias significativas entre CNO (media  $\pm$  SEM:  $10,85 \pm 2,85$ ;  $18,08 \pm 3,11$ ) y ratones tratados con solución salina (media  $\pm$  SEM:  $8,56 \pm 2,66$ ;  $19,90 \pm 3,42$ ), ni en la impulsividad ni en la sensibilidad a la recompensa respectivamente (Figura 5f- g). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos cuando la población de los grupos de solución salina y CNO se dividió en adictos y no adictos (Figura 5h-i).

Para confirmar que el tratamiento con CNO no produjo ningún efecto que pudiera sesgar nuestros resultados de autoadministración, se controló el peso corporal, la actividad locomotora y la ingesta de alimentos de los ratones durante todo el experimento. No se observaron diferencias significativas entre los ratones tratados con solución salina y CNO en términos de peso corporal (Figura 5j) y consumo de alimentos (datos no mostrados) en todo el experimento. Además, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la actividad locomotora (Figura 5k), lo que sustenta la ausencia de efectos secundarios del tratamiento con CNO.

### **Objetivo o fase 3. Efectos del THC durante la adolescencia en la adicción al cannabis.**

#### **Efectos del pretratamiento con THC durante la adolescencia en el modelo operante de comportamiento similar a la adicción a los cannabinoides mediante el entrenamiento de autoadministración de WIN 55,212-2 en la edad adulta.**

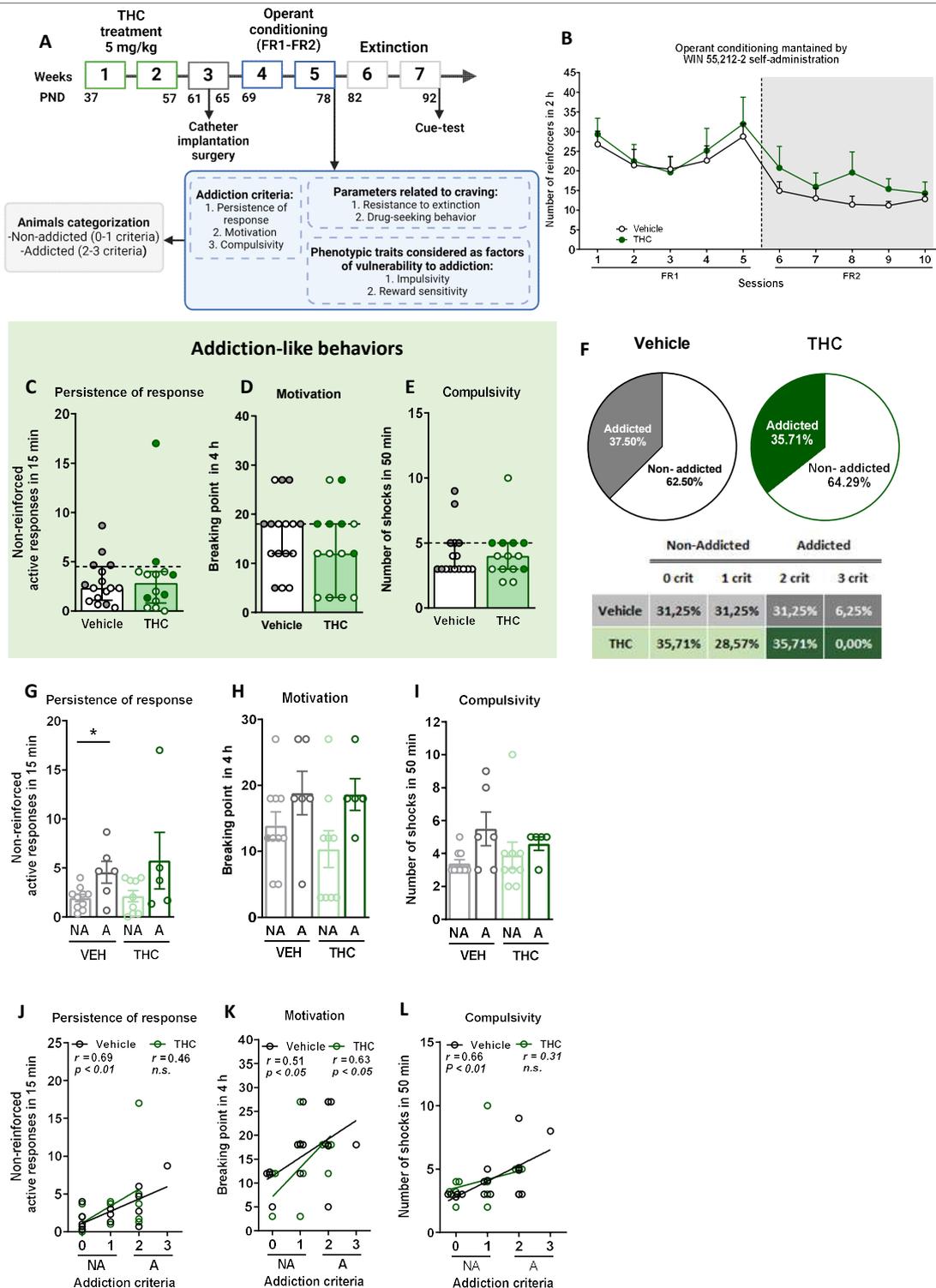
Exploramos los efectos de la exposición al THC en ratones adolescentes en las firmas conductuales específicas del comportamiento similar a la adicción al cannabis en la edad adulta. Los ratones fueron entrenados para adquirir un condicionamiento de autoadministración operante mantenido por infusiones iv de WIN 55,212-2 bajo un programa de refuerzo FR1 durante 5 sesiones seguidas de 5 sesiones bajo FR2, para un total de 10 sesiones consecutivas (Figura 6A). Bajo el programa FR1, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones pretratados con THC y vehículo, lo que sugiere efectos de refuerzo similares de WIN 55,212-2 (ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,28) = 0,00$ , n.s., Figura 6B). Cuando el requerimiento se incrementó a FR2, los ratones pretratados



---

con THC mostraron una tendencia a obtener un mayor número de reforzadores (Media  $\pm$  S.E.M. de las últimas tres sesiones operantes= $15,7\pm 3,18$ ) en comparación con los ratones pretratados con vehículo (Media  $\pm$  S.E.M. de las últimas tres sesiones operantes= $11,81\pm 1,31$ ), que se mantuvo hasta el final de las sesiones (ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,28)=1,00$ , n.s.). La adquisición de aprendizaje operante fue equivalente entre grupos (porcentaje de ratones que habían adquirido la conducta: 58,82 % de vehículo y 50 % de THC, chi-cuadrado,  $C-S=0,45$ , n.s.).

---



**Figura 6.** La administración de THC durante la adolescencia condujo al desarrollo de un fenotipo adictivo después de la autoadministración operante de WIN 55,212-2 en ratones adultos. A. Cronología de la secuencia experimental del modelo de ratón de autoadministración WIN 55,212-2. B. Número de infusiones obtenidas por vehículos y grupos pretratados con THC durante 2 h de autoadministración operante mantenida por infusiones intravenosas de WIN 55,212-2 bajo programas de refuerzo FR1 y FR2 (media  $\pm$  SEM, ANOVA de medidas repetidas). C-E. Los ratones presentaron respuestas similares en las tres pruebas de criterios similares a la adicción (datos individuales con mediana y rango intercuartílico): C. Persistencia de la respuesta: número de respuestas activas durante el período de 15 minutos sin drogas (U Mann-Whitney). D. Motivación: El



punto de ruptura determinado durante un programa progresivo de refuerzo de 4 h representa el número máximo de respuestas que un animal es capaz de emitir para obtener una infusión de fármaco (prueba t de Student). E. Compulsividad: Número de descargas recibidas siguiendo el cronograma descrito en la sección de Materiales y Métodos, reflejando el nivel de compulsividad de cada grupo (U Mann-Whitney). La línea horizontal discontinua indica el percentil 75 de la distribución del grupo, utilizado como umbral para considerar un ratón positivo para un criterio. Los ratones "adictos" se representan en círculos grises para el grupo de vehículos y círculos verdes para el grupo de THC. F. Porcentaje de ratones categorizados como "adictos" (Chi cuadrado). SOLDADO AMERICANO. Pruebas de comportamiento de los tres criterios similares a la adicción cuando se separan entre "adicto" y "no adicto" (datos individuales con mediana y rango intercuartílico, prueba t de Student para persistencia y motivación, U Mann-Whitney para compulsividad, \* $P < 0.05$ ). J-L. Correlaciones de Pearson entre los valores individuales de los criterios de adicción y J. respuestas activas no reforzadas en 15 min, K. punto de ruptura en 4 h y L. número de descargas en 50 min. (nVehículo = 16, nTHC = 14).

### **Modelo de ratón de comportamiento similar a la adicción mediante autoadministración de WIN 55,212-2 y pretratamiento con THC durante la adolescencia.**

Después del entrenamiento operante, se evaluaron los comportamientos similares a la adicción, como se explicó anteriormente. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones pretratados con THC y con vehículo en ninguno de los criterios similares a la adicción, a saber, la persistencia de la respuesta, la motivación y la compulsividad (Figura 6C-E). Como era de esperar, en ambos grupos se observaron subpoblaciones extremas que presentan una alta persistencia de respuesta, motivación y compulsividad. Además, se encontraron correlaciones positivas entre el número de respuestas a cada criterio similar a la adicción (respuestas activas no reforzadas, punto de quiebre o número de descargas) y el número de criterios similares a la adicción logrados en el grupo vehículo, mientras que el grupo THC presentó solo una correlación positiva para la motivación (correlaciones de Pearson,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , Figura 6J-L), donde los ratones "adictos" mostraron los valores más altos. Los ratones clasificados individualmente en el grupo "adicto" siguiendo los criterios descritos anteriormente fueron 37,5 % en el grupo pretratado con vehículo y 35,71 % en ratones que recibieron THC durante la adolescencia (Chi-cuadrado, C-S = 0,019, n.s., Figura 6F). Con base en esta clasificación, se compararon comportamientos similares a los de la adicción, lo que reveló que los ratones "adictos" tratados previamente con vehículo tenían una mayor persistencia de respuesta que los ratones "no adictos" (prueba t de Student,  $t = -2.72$ ,  $p < 0.05$ , Figura 6G), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre ratones "adictos" y "no adictos" en términos de motivación y compulsividad independientemente del tratamiento (Figura 6H-I).

### **La exposición previa al THC durante la adolescencia disminuyó la resistencia a la extinción en la edad adulta.**

Luego, los ratones se sometieron a 12 sesiones de extinción. La tendencia de extinción de ambos grupos fue similar, lo que indica que ambos mostraron la misma capacidad para extinguir el comportamiento de autoadministración (ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,26)=1,20$ , n.s., Figura 7A). El 26,7 % del vehículo y el 8,3 % de los ratones pretratados con THC (Chi-cuadrado, C-S=2,06, n.s.) adquirieron los criterios de extinción, como se describió anteriormente.

Se evaluaron dos parámetros estrechamente relacionados con el ansia y el restablecimiento de la búsqueda de drogas. Primero, el patrón de actividad en el primer día de extinción se evaluó cada 10 minutos como una medida de resistencia a la extinción. Todos los grupos respondieron en gran medida al agujero activo al comienzo de la sesión, lo que significa que los ratones buscaban el reforzador y la señal de luz asociada con él. Sin embargo, a medida que continuaron las sesiones no reforzadas, vemos que este comportamiento disminuyó, lo cual es característico de un comportamiento de extinción.



---

Los ratones pretratados con THC respondieron menos durante la primera sesión de extinción que los ratones pretratados con vehículo (prueba t de Student,  $t=-2,18$ ,  $p<0,05$ , Figura 7B). En un análisis ANOVA de dos vías, este efecto de tratamiento global también se observó entre ratones pretratados con THC y vehículo. Al separar los grupos en "adictos" y "no adictos", se observó una mayor resistencia a la extinción en los ratones "adictos" en comparación con los "no adictos" (ANOVA de dos vías, efecto del tratamiento:  $F(1, 25)=6,872$ ,  $p<0,05$ , Efecto del fenotipo:  $F(1, 25)=12,52$ ,  $p<0,01$ , Interacción:  $F(1, 25)=1,998$ , n.s., Figura 7D). En el grupo del vehículo, las respuestas activas en la primera sesión fueron muy altas y disminuyeron entre sesiones hasta reducirse en un 70 % en la última sesión en comparación con la primera, mientras que los ratones pretratados con THC disminuyeron solo en un 30 % (Figura 7A). Además, la respuesta activa en ambos grupos fue significativamente mayor que la respuesta inactiva (ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,48)=15,26$ ,  $p<0,001$ , DMS post hoc test: Activos vs. Inactivos:  $p<0,001$  en todas las comparaciones). En la primera, tercera y cuarta sesiones de extinción, los ratones pretratados con vehículo mostraron una menor respuesta a la extinción en comparación con los ratones pretratados con THC (prueba t de Student,  $p<0,05$ ).

El restablecimiento o recaída del comportamiento de búsqueda de drogas se evaluó después de que los ratones alcanzaran la extinción. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos pretratados con vehículo y THC con respecto al restablecimiento del comportamiento de búsqueda de drogas inducido por señales. Solo se reveló una diferencia significativa al comparar ratones "adictos" y "no adictos" pretratados con vehículo. De hecho, los ratones "adictos" pretratados con vehículo presentaron respuestas más altas que los ratones "no adictos" al vehículo (U Mann-Whitney,  $U=10.000$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 7C-2E).

---

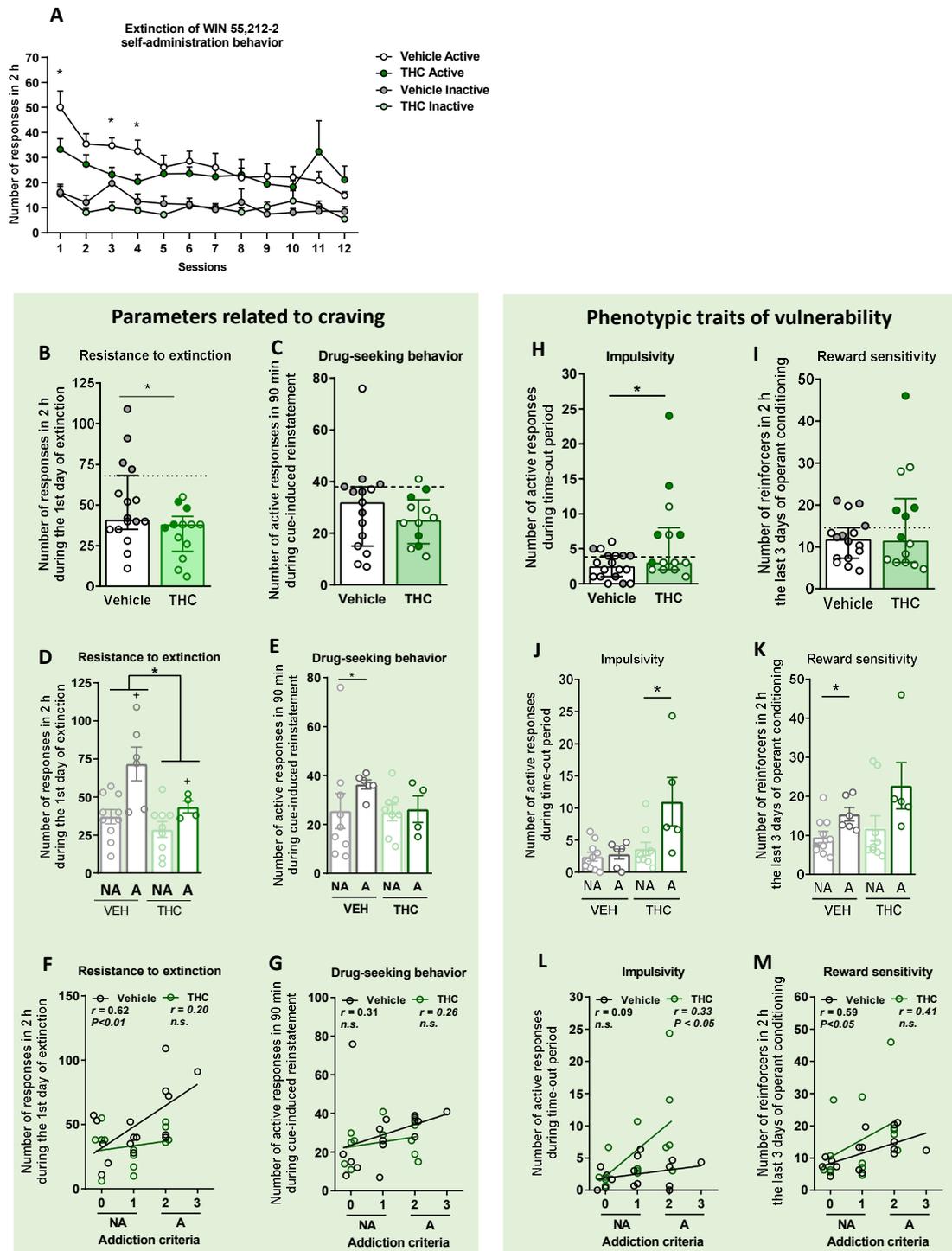


Figura 7. La administración de THC durante la adolescencia favoreció los parámetros relacionados con el craving y los rasgos de vulnerabilidad fenotípica al comportamiento similar a la adicción después de la autoadministración operante de WIN 55,212-2 en ratones adultos. A. Patrón de extinción del comportamiento de autoadministración de WIN 55,212-2 (media  $\pm$  S.E.M., ANOVA de medidas repetidas). A-c. Pruebas de comportamiento de los dos parámetros relacionados con el craving (datos individuales con mediana y rango intercuartílico): B. Resistencia a la extinción: el número de respuestas activas de toque de nariz durante las primeras 2 horas de la sesión de extinción es significativamente mayor en el vehículo en comparación con el THC pre -ratones tratados (prueba t de Student,  $*P < 0,05$ ). C. Comportamiento de búsqueda de drogas cuando el restablecimiento inducido por señales después de la abstinencia: número de respuestas activas realizadas durante la



prueba de búsqueda de drogas inducida por señales de 90 min realizada después de la extinción (prueba t de Student). La línea horizontal discontinua indica el percentil 75 de distribución del grupo, utilizado como umbral para considerar un ratón positivo para un criterio. Los ratones "adictos" se representan en círculos grises para el grupo de vehículos y círculos verdes para el grupo de THC. DELAWARE. Pruebas de comportamiento respecto a los parámetros relacionados con el craving al separar entre ratones "adictos" y "no adictos" (datos individuales con media  $\pm$  S.E.M.): D. En resistencia a la extinción, se detectó un efecto del pretratamiento con THC entre vehículo y Grupos de THC, así como un efecto del fenotipo entre ratones "adictos" y "no adictos" (ANOVA de dos vías, efecto del tratamiento = \* P <0.05, efecto del fenotipo = + P <0.01). E. Se observó un mayor comportamiento de búsqueda de drogas en los animales pretratados con vehículo "adictos" en comparación con los "no adictos" (U Mann-Whitney, \*P<0,05). F-G. Correlaciones de Pearson entre los valores individuales de los criterios similares a la adicción y F. número de respuestas en 2 h durante el primer día de extinción y G. número de respuestas en 90 min durante la prueba de reincorporación inducida por señal. HOLA. Pruebas conductuales utilizadas para evaluar los rasgos fenotípicos considerados factores de vulnerabilidad a la conducta adictiva (datos individuales con mediana con rango intercuartílico): H. Impulsividad: Número de respuestas al toque de nariz en el agujero activo durante el tiempo de espera de 10 s ( Prueba t de Student, \*P<0,05) I. Sensibilidad a la recompensa: Número de reforzadores realizados en el agujero activo durante las 2 h de las últimas tres sesiones de autoadministración (U Mann-Whitney). J-K. Pruebas de comportamiento de los rasgos fenotípicos que muestran una mayor sensibilidad a la recompensa en ratones "adictos" pretratados con vehículo en comparación con "no adictos", mientras que esta diferencia se observó en el grupo de THC para la impulsividad (datos individuales con media  $\pm$  S.E.M., U Mann-Whitney, \*P<0,05). L-M. Correlaciones de Pearson entre los valores individuales de los criterios similares a la adicción y L. número de respuestas activas durante el tiempo de espera, M. número de reforzadores en 2 h en los últimos tres días consecutivos de entrenamiento operante. (nVehículo = 16, nTHC = 14).

### **La exposición al THC durante la adolescencia aumentó el comportamiento similar a la impulsividad en la edad adulta.**

Se evaluaron dos rasgos fenotípicos adicionales considerados como factores de vulnerabilidad al abuso de sustancias. Los ratones pretratados con THC mostraron un comportamiento similar a la impulsividad más alto en comparación con los ratones pretratados con vehículo (prueba t de Student,  $t = -2.17$ ,  $p < 0.05$ , Figura 7H), un efecto que fue más pronunciado en los ratones "adictos" pretratados con THC (U Mann-Whitney,  $U = 6.500$ ,  $p < 0.05$ , Figura 2J). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos pretratados con vehículo y THC para la sensibilidad a la recompensa durante los últimos tres días de entrenamiento operante (Figura 7I), aunque los ratones "adictos" pretratados con vehículo tenían más sensibilidad a la recompensa en comparación con los "no adictos" (U Mann-Whitney,  $U = 10.000$ ,  $p < 0.05$ , Figura 7K). Estos resultados fueron enfatizados por las correlaciones positivas encontradas entre el número de respuestas a cada criterio similar a la adicción y el número de criterios similares a la adicción logrados (correlaciones de Pearson, Figuras 7F-G, 2L-M).

### **Los subgrupos de alta y baja impulsividad revelan diferencias de comportamiento en ratones adultos después de la autoadministración de WIN 55,212-2.**

Para investigar más a fondo el comportamiento impulsivo mejorado promovido por la exposición previa al THC, los ratones se clasificaron en subgrupos de alta impulsividad y baja impulsividad definidos de acuerdo con la mediana. Encontramos 50,0 % de ratones altamente impulsivos en el grupo vehículo y 71,43 % en el grupo THC (Chi-cuadrado,  $C-S = 2,571$ , n.s., Figura 8A). Los ratones altamente impulsivos pretratados con THC mostraron un mayor número de respuestas activas durante el período de tiempo de espera en comparación con los ratones altamente impulsivos pretratados con vehículo, así como los ratones poco impulsivos tanto en FR1 (medidas repetidas ANOVA,  $F(1,26) = 3.46$ ,  $p < 0.05$ , prueba DMS post hoc: HI THC vs. vehículo HI:  $p < 0.05$ , HI THC vs. vehículo LI:  $p < 0.05$ , Figura 8B) y programas FR2 (medidas repetidas ANOVA,  $F(1,26) = 7,86$ ,  $p < 0,001$ , prueba DMS post hoc: HI THC frente a vehículo HI:  $p < 0,01$ , HI THC frente a vehículo LI:  $p < 0,001$ ). Además, los ratones altamente impulsivos pretratados con THC obtuvieron una mayor cantidad de reforzadores durante el condicionamiento operante cuando se probaron bajo el programa FR1 en comparación con los ratones poco impulsivos pretratados con THC (medidas

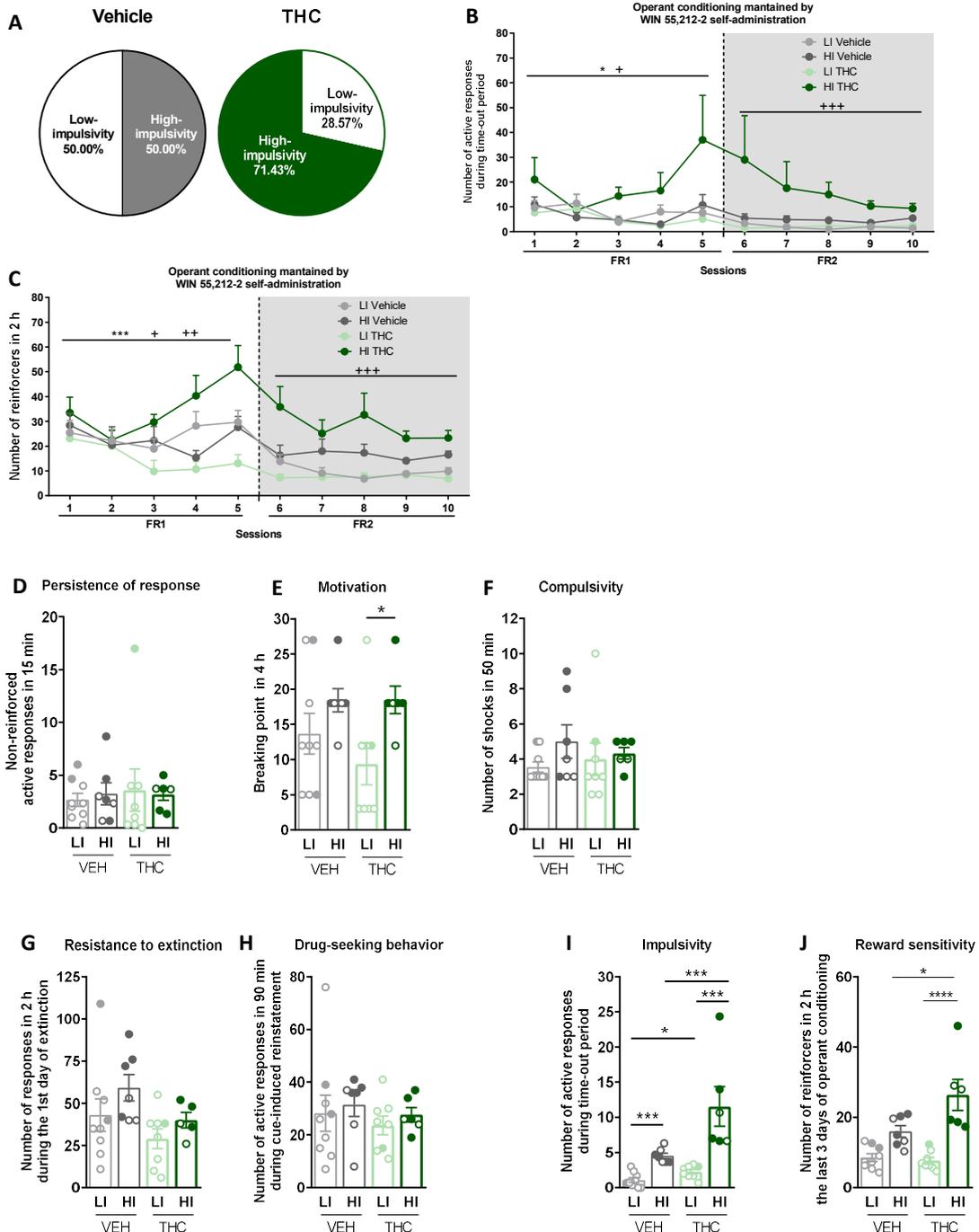


---

repetidas ANOVA,  $F(1,26) = 3.44$ ,  $p < 0.05$ , test post hoc DMS: HI THC vs. LI THC:  $p < 0.01$ , Figura 8C), así como a ratones altamente impulsivos pretratados con vehículo durante las sesiones 4 (U Mann-Whitney,  $U=1.000$ ,  $p < 0,01$ ) y 5 (U Mann-Whitney,  $U=7,000$ ,  $p < 0,05$ ). Además, los ratones altamente impulsivos pretratados con THC presentaron respuestas más altas en el programa FR2 en comparación con los ratones altamente impulsivos pretratados con vehículo y los ratones poco impulsivos (medidas repetidas ANOVA,  $F(1,26) = 12.73$ ,  $p < 0,001$ , prueba DMS post hoc: HI THC frente a vehículo HI:  $p < 0,01$ , HI THC frente a vehículo LI:  $p < 0,001$  y HI THC frente a LI THC:  $p < 0,001$ ). Además, los ratones altamente impulsivos presentaron una mayor motivación en comparación con los ratones poco impulsivos solo en el grupo pretratado con THC, mientras que no se revelaron resultados significativos para otros criterios similares a la adicción (U Mann-Whitney,  $U = 7.000$ ,  $p < 0.05$ , Figura 8D-F).

No se revelaron diferencias significativas en los parámetros relacionados con el craving (Figura 8G-H). Tanto los ratones poco impulsivos (U Mann-Whitney,  $U=15.000$ ,  $p < 0.05$ ) como los ratones altamente impulsivos (U Mann-Whitney,  $U=.000$ ,  $p < 0.001$ ) que recibieron THC durante la adolescencia muestran valores más extremos de impulsividad en comparación con aquellos pretratados con vehículo (Figura 8I). Como era de esperar, los ratones de alta impulsividad tienen mayor impulsividad que los ratones de baja impulsividad independientemente del tratamiento (U Mann-Whitney,  $U=.000$ ,  $p < 0.001$  para vehículo, y U Mann-Whitney,  $U=.000$ ,  $p < 0.001$  para THC). En cuanto a la sensibilidad a la recompensa, se encontró una diferencia fenotípica entre ratones de baja impulsividad y alta impulsividad, así como un efecto del tratamiento y de la interacción entre ambos (ANOVA de dos vías, Efecto del fenotipo:  $F(1, 26) = 39,38$ ,  $p < 0,001$ , Efecto del tratamiento:  $F(1, 26) = 5,194$ ,  $p < 0,05$ , Interacción:  $F(1, 26) = 7,314$ ,  $p < 0,05$ , Figura 8J). Los animales altamente impulsivos pretratados con THC mostraron una mayor sensibilidad a la recompensa en comparación con los ratones poco impulsivos pretratados con THC (comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,001$ ), así como con los ratones altamente impulsivos pretratados con vehículo (comparaciones múltiples de Tukey). comparaciones,  $p < 0,05$ ) o alteraciones conductuales o somáticas a largo plazo.

---



**Figura 8. Caracterización de los subgrupos de baja impulsividad (LI) y alta impulsividad (HI).** (A) Porcentaje de ratones categorizados como LI y HI (Chi-cuadrado). (B) Los ratones HI pretratados con THC mostraron un mayor número de respuestas durante el periodo de tiempo de espera bajo los programas FR1 y FR2 en comparación con los ratones HI pretratados con vehículo, así como con los ratones LI (medidas repetidas ANOVA, \* p < 0,05 efecto de la sesión en FR1, +p < 0,05 efecto del tratamiento en FR1, +++p < 0,001 efecto del tratamiento en FR2). (C) Los ratones HI pretratados con THC mostraron una mayor adquisición del condicionamiento operante bajo el programa FR2 en comparación con los ratones HI pretratados con vehículo, así como con los ratones LI (medidas repetidas ANOVA, \*\*\*p < 0,001 efecto de sesión en FR1, ++p < 0,01 tratamiento x efecto de sesión en FR1, +p < 0,05 efecto de tratamiento en FR1, +++p < 0,001 efecto de tratamiento en FR2). (D-F) Pruebas de comportamiento de los tres criterios similares a la adicción cuando se separan entre LI y HI (media  $\pm$  SEM, U Mann-Whitney, \* p < 0.05). (G-J) Pruebas de comportamiento de (G,H) dos parámetros relacionados con el craving (prueba t de Student o U Mann-Whitney) y (I,J) los dos rasgos de vulnerabilidad fenotípica cuando se separan entre LI y HI (media  $\pm$



---

SEM, impulsividad: prueba t de Student o U Mann-Whitney, sensibilidad de recompensa: ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples de Tukey, \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 (nVehicle = 16, nTHC = 14).

### **El pretratamiento con THC no produjo alteraciones conductuales o somáticas importantes a largo plazo.**

La exposición al THC produce una serie de alteraciones somáticas y de comportamiento. Se monitorearon varias respuestas conductuales y somáticas (peso corporal, ingesta de alimentos y actividad locomotora) a lo largo del experimento para verificar que el pretratamiento con THC durante la adolescencia a la dosis de 5 mg/kg no producía ningún efecto a largo plazo en la edad adulta. No se observaron diferencias significativas entre los ratones pretratados con THC y con vehículo en el peso corporal y la ingesta de alimentos durante toda la secuencia operante, aunque la ganancia de peso de los ratones pretratados con THC fue aparentemente menor que la de los ratones pretratados con vehículo durante la secuencia. tratamiento de adolescentes. Esto está de acuerdo con estudios previos que emplean protocolos similares que han demostrado que el tratamiento con THC puede reducir el aumento de peso en ratones adolescentes en comparación con animales pretratados con vehículo (7). Además, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el número de interrupciones del haz por 10 min durante 120 min, lo que respalda la ausencia de una alteración conductual importante promovida por la exposición previa al THC.

### **Análisis de componentes principales de la exposición a THC durante la adolescencia en la autoadministración de WIN 55,212-2 en la edad adulta.**

Se utilizó el análisis de componentes principales para caracterizar si los resultados conductuales descritos anteriormente podrían reducirse a menos dimensiones. Se tuvieron en cuenta todos los criterios similares a la adicción, los parámetros relacionados con el craving y los rasgos fenotípicos. Este análisis separó dos grupos claros que representan la separación entre los grupos "adictos" y "no adictos" y ambas poblaciones presentan claras diferencias de comportamiento que permiten una distinción (Figura 9B). El componente 1 representa el 26,2 % de la varianza (Figura 9A-B) y tiene fuertes cargas (>0,7) de tres variables de comportamiento: motivación, impulsividad y sensibilidad a la recompensa. El segundo componente es ortogonal al componente 1, explica el 26,0 % de la varianza y comprende cuatro variables: los criterios de persistencia de la respuesta, compulsividad, resistencia a la extinción y conducta de búsqueda de drogas. La impulsividad participa más en el primer componente, mientras que la compulsividad es más crítica en el segundo componente (Figura 9C-D), asemejándose a la característica secuencial de la transición de impulsividad a compulsividad que se ha descrito en la adicción (8). Además, la motivación y la compulsividad pertenecen a diferentes componentes, ya que el sustrato neuronal de cada criterio de adicción es diferente (9).

---

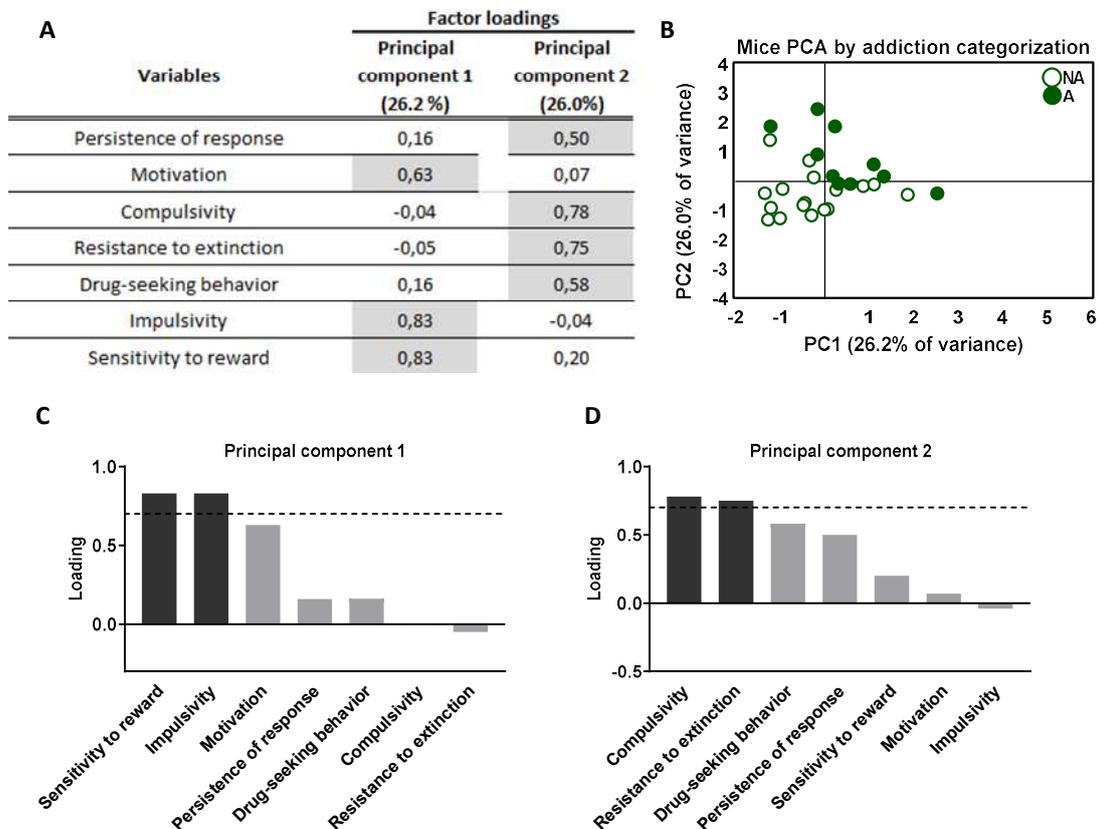


Figura 9. Análisis de componentes principales del efecto de la exposición de adolescentes a THC en la autoadministración operante de WIN 55,212-2 en la edad adulta. (A) Cargas factoriales del componente principal 1 (PC1) y del componente principal 2 (PC2) para todas las variables estudiadas. (B) Ratones individuales agrupados según adicción o no adicción en el espacio producido por los 2 componentes de PCA, que representaron la varianza máxima de datos, con cargas factoriales del 26,2 % para PC1 y del 26,0 % para PC2. (C,D) Orden de carga factorial de las diferentes variables en PC1 y PC2. La línea horizontal discontinua marca una carga superior a 0,7, lo que contribuye principalmente al componente. En cuanto a los criterios similares a la adicción, se puede observar una disociación entre la motivación, que contribuye principalmente a PC1, y la compulsividad, que contribuye principalmente a PC2. Además, la impulsividad y la sensibilidad a la recompensa pesaron más en el PC1, mientras que la resistencia a la extinción y la búsqueda de drogas pesaron más en el PC2.

### Mapa de calor de correlación entre los criterios de adicción, los parámetros relacionados con el craving y los rasgos fenotípicos de vulnerabilidad.

Al representar los criterios similares a la adicción, los parámetros relacionados con las ansias y los rasgos fenotípicos en un mapa de calor (Figura 10), revelamos correlaciones significativas en animales "no adictos" entre la persistencia de la respuesta y la impulsividad ( $r=0.49$ ,  $p<0.05$ ), persistencia de respuesta y sensibilidad a la recompensa ( $r=0.54$ ,  $p<0.05$ ), persistencia de respuesta y conducta de búsqueda de drogas ( $r=0.52$ ,  $p<0.05$ ) y sensibilidad a la recompensa e impulsividad ( $r=0.91$ ,  $p<0.05$ ). En animales "adictos", se reveló una correlación significativa entre el comportamiento de búsqueda de drogas y drd2 NAc ( $r = 0,76$ ,  $p < 0,01$ ).

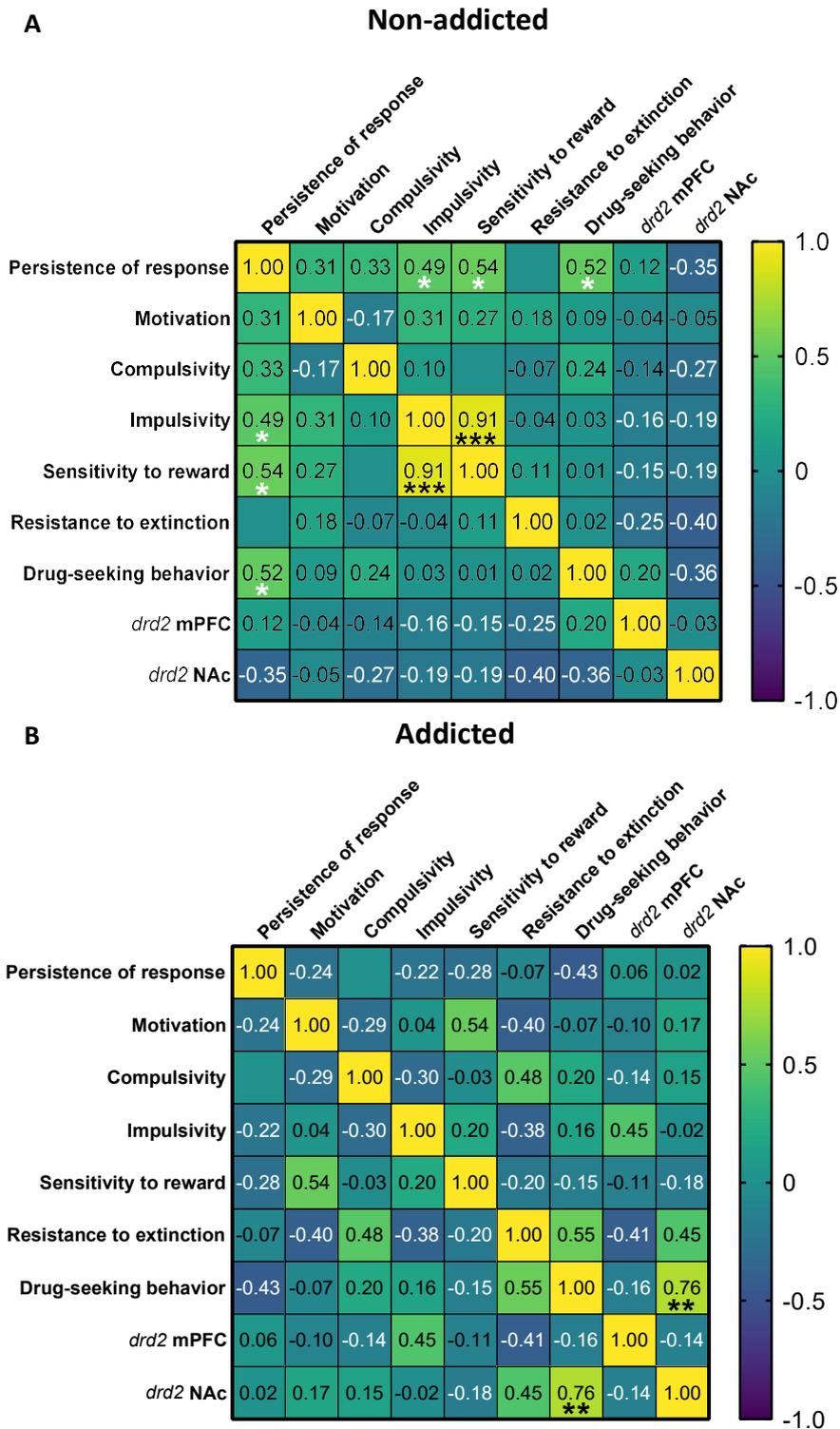


Figura 10. Heatmap de correlación de las variables de criterios de adicción al cannabis, parámetros relacionados con el craving y rasgos fenotípicos de vulnerabilidad. (A,B) Correlaciones de Pearson entre los tres criterios similares a la adicción, los dos parámetros relacionados con el ansia y los dos rasgos fenotípicos en los grupos (A) "no adictos" y (B) "adictos" (correlación de Pearson, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



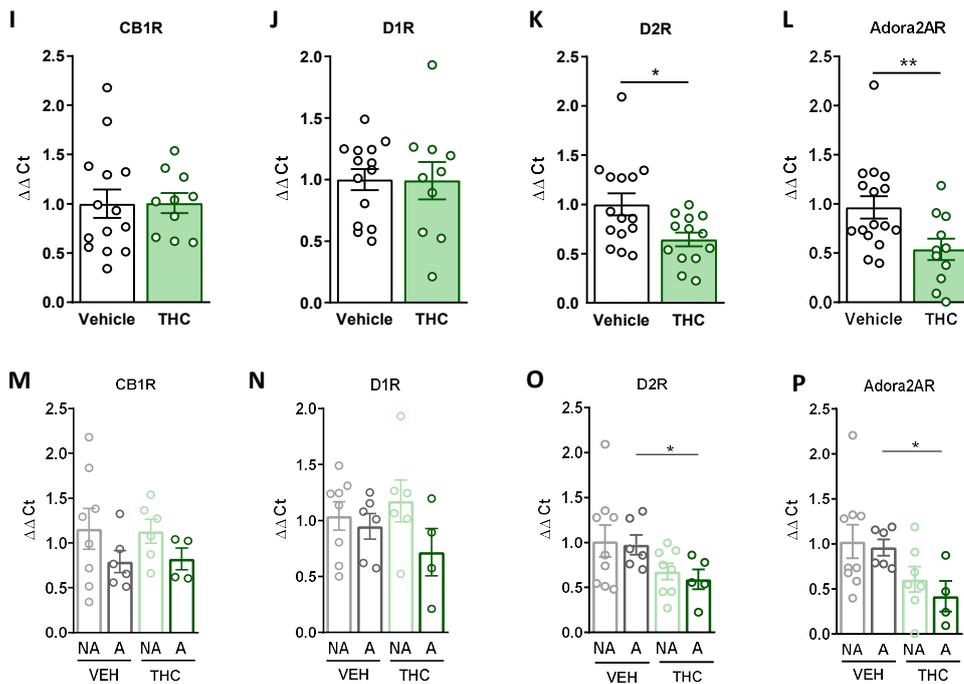
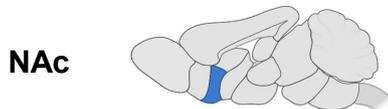
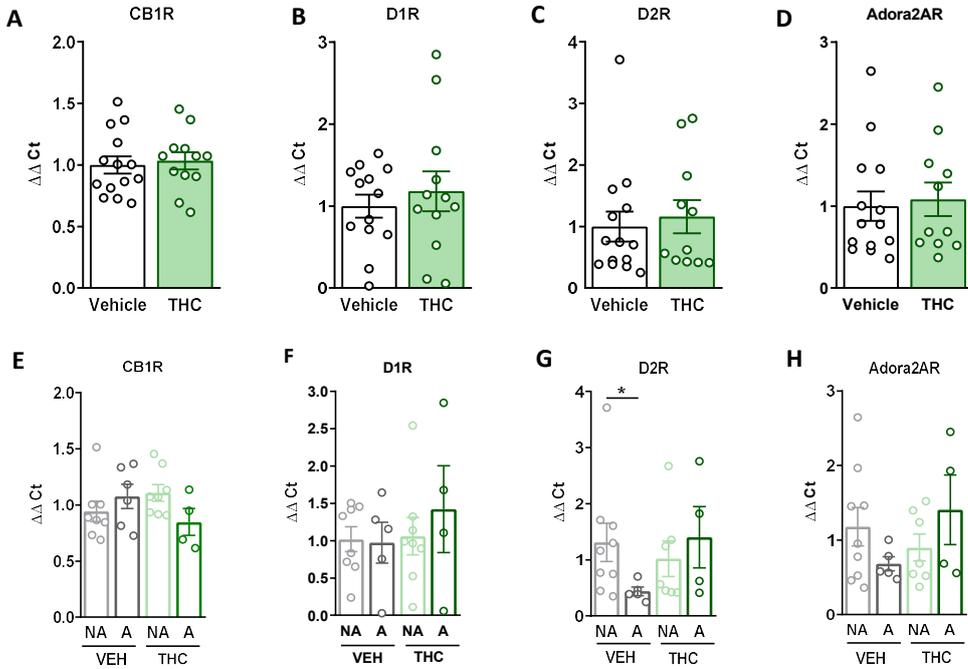
---

**Objetivo o fase 4. Determinar los niveles de expresión de los receptores D2 en el NAc.**

**La exposición al THC durante la adolescencia produjo una regulación a la baja de la expresión de los genes *drd2* y *adora2a* en NAc y HPC.**

La mPFC, NAc, DS y HPC se extrajeron al final de la evaluación operante para estudiar posibles alteraciones neurobiológicas promovidas por la preexposición al THC durante la adolescencia. En un estudio anterior, se encontró que la expresión de los genes *drd1*, *drd2* y *adora2a* aumentaba en ratones adictos a la comida y la cocaína después de paradigmas de autoadministración operante (10). Además, se ha revelado que el gen *cnr1* está implicado en los trastornos adictivos. En consecuencia, se realizaron ensayos de RT-qPCR para comparar la expresión génica diferencial de estos genes candidatos en áreas del circuito mesocorticolímbico. No se revelaron diferencias significativas entre los ratones pretratados con THC y vehículo en el mPFC (Figura 11A-D). Sin embargo, se observó una regulación a la baja en la expresión del gen *drd2* en ratones "adictos" pretratados con vehículo en comparación con los "no adictos" en esta área del cerebro (U Mann-Whitney,  $U = 6.000$ ,  $p < 0.05$ , Figura 11G ). En NAc, la expresión de *drd2* y *adora2a* se reguló significativamente a la baja en ratones pretratados con THC en comparación con el vehículo (prueba t de Student,  $t = 2,60$ ,  $p < 0,05$  y  $t = 2,83$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente, Figura 11K-L), y estas diferencias se encontraron específicamente en ratones "adictos" (prueba t de Student,  $t = 2,44$ ,  $p < 0,05$  y  $t = 3,10$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente, Figura 11O-P). De manera similar, la expresión de *drd2* y *adora2a* se reguló a la baja en ratones pretratados con THC en el HPC (prueba t de Student,  $t = 2.54$ ,  $p < 0.01$  y U Mann-Whitney,  $U = 31.000$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente, Figura 12K-L ), y estas diferencias se encontraron específicamente en ratones "adictos" (prueba t de Student,  $t = 3,18$ ,  $p < 0,05$  y  $t = 3,06$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente, Figura 12O-P). No se encontraron diferencias significativas en el DS (Figura 12A-H).

---





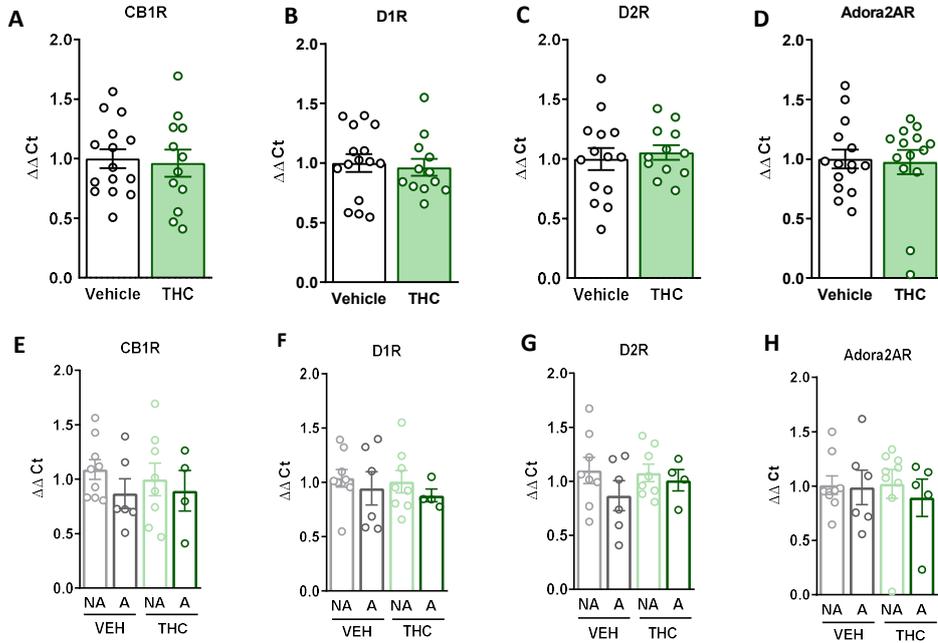
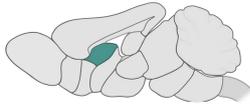
---

**Figura 11. Expresión de los genes *drd1*, *drd2*, *adora2a* y *cnr1* en la corteza prefrontal medial (mPFC) y el núcleo accumbens (NAc) después de la exposición de adolescentes a THC en ratones adultos autoadministrados con WIN 55,212-2 operante.** A-H. Expresión génica medida por el  $\Delta\Delta Ct$  tras RT-qPCR de *cnr1*, *drd1*, *drd2* y *adora2a* en el PFC: A-D. entre ratones pretratados con vehículo y THC respectivamente (media  $\pm$  SEM, prueba t de Student para CB1R y D1R, U Mann-Whitney para D2R y Adora2AR), E-H. entre ratones "adictos" y "no adictos" respectivamente (media  $\pm$  SEM, prueba t de Student o U Mann-Whitney, \* P <0.05). I-P. Expresión génica medida por el  $\Delta\Delta Ct$  tras qPCR de *cnr1*, *drd1*, *drd2* y *adora2a* en la NAc: I-L. entre ratones pretratados con vehículo y THC respectivamente (media  $\pm$  S.E.M., prueba t de Student, \*P<0.05, \*\*P<0.01), M-P. entre ratones "adictos" y "no adictos" respectivamente (media  $\pm$  SEM, prueba t de Student o U Mann-Whitney, \* P <0.05) (nVehicle = 16, nTHC = 14) .

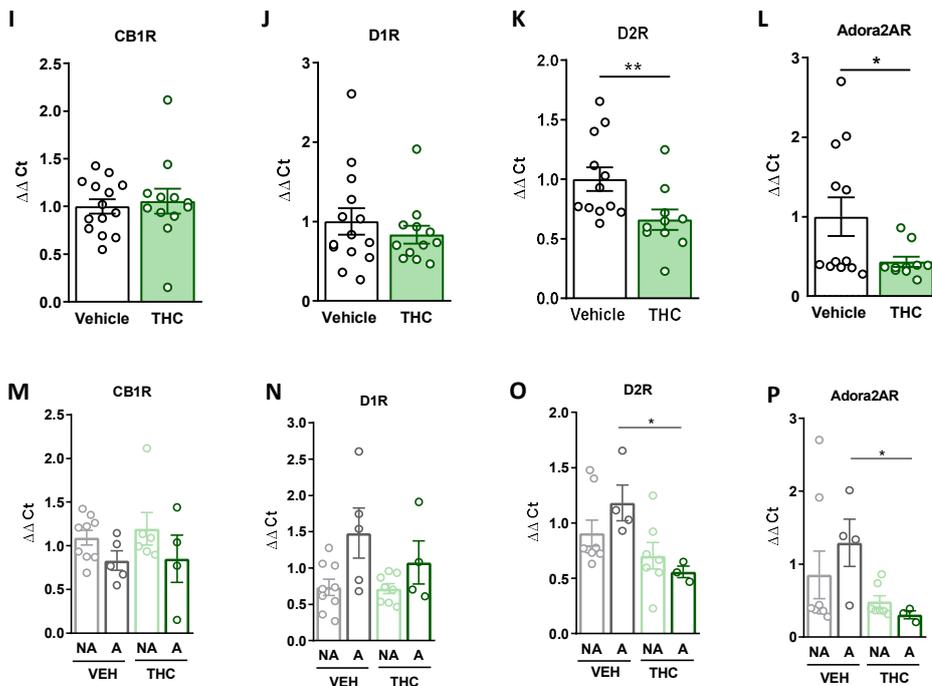
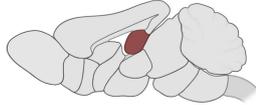
---



**DS**



**Hippocampus**







**Figura 13. Esquema del protocolo experimental de adicción al cannabis** (panel superior). En el panel inferior se observan los resultados obtenidos en cada uno de los criterios diagnósticos de adicción al cannabis como la persistencia de respuesta, la motivación y la compulsividad en los grupos salino y *drd2*. Finalmente se muestran los porcentajes de animales que cumplen los criterios de adicción entre los grupos control salino (n=32) y animales que sobreexpresan el receptor D2 de la dopamina (n=15).

## DISCUSIÓN:

La adicción al cannabis, definida en la 5ª edición del DSM como trastorno por consumo de cannabis, es una preocupación importante en todo el mundo, y su sustrato neurobiológico aún se desconoce en gran medida. La ausencia de modelos animales que recapitulen las características de la adicción a los cannabinoides ha perjudicado la investigación con animales centrada en este trastorno. En este estudio, desarrollamos por primera vez un modelo animal de adicción a cannabinoides que recapitula los principales criterios de diagnóstico de este trastorno definidos en el DSM-5 basado en un paradigma operante de WIN 55,212-2 iv autoadministración.

Los paradigmas de autoadministración de drogas basados en sus efectos de refuerzo positivo pueden usarse para modelar ciertos aspectos del comportamiento adictivo humano. Sin embargo, estudios previos han demostrado la complejidad de modelar la autoadministración de cannabis en comparación con otras drogas debido a la dificultad de obtener una autoadministración confiable de cannabinoides en animales. La autoadministración operante de THC es difícil de mantener de manera confiable en animales. Solo unos pocos estudios en monos y ratas han podido demostrar que el THC puede mantener la autoadministración (intravenosa o con vapor) sin antecedentes previos de exposición a otras drogas. La dificultad del THC para actuar como reforzador en estudios con animales se ha relacionado con la aparición tardía de efectos farmacológicos placenteros, la larga duración de sus efectos farmacológicos y conductuales y su perfil de agonista parcial (11). Debido a estas dificultades, la mayoría de los estudios de autoadministración operante han utilizado cannabinoides sintéticos. WIN 55,212-2 es un cannabinoide sintético potente con una vida media más corta que el THC y un agonista completo de CB1R. Estas características pueden explicar la diferencia en las propiedades de refuerzo y las características de mejora de los modelos de autoadministración operante en comparación con el THC (12). Varios estudios han logrado paradigmas operantes confiables para autoadministrarse WIN 55,212-2 en ratones y ratas. Sin embargo, ninguno de estos estudios de autoadministración se ha utilizado para generar un modelo de adicción a los cannabinoides.

En nuestro estudio, hemos establecido un modelo en el que los ratones vulnerables presentan persistencia para autoadministrarse WIN 55,212-2, una motivación extremadamente alta para obtener infusiones de WIN 55,212-2 y compulsividad para buscar WIN 55,212-2 y autoadministrarse a pesar de los efectos adversos. consecuencias, lo que confirma el desarrollo de un modelo similar a la adicción a los cannabinoides basado en infusiones iv de WIN 55,212-2. Estos criterios permitieron separar dos poblaciones de ratones con fenotipos vulnerables y resilientes para desarrollar adicción a los cannabinoides. Por lo tanto, el establecimiento de este modelo de ratón de adicción a los cannabinoides utilizando la autoadministración WIN 55,212-2 iv representa una herramienta fundamental para futuras investigaciones que permitan dilucidar los correlatos



neurobiológicos subyacentes a la resiliencia y la vulnerabilidad para desarrollar este trastorno. Estas características similares a las de la adicción utilizadas para establecer este modelo de adicción a los cannabinoides se extrajeron de un modelo establecido de adicción a la cocaína en ratas (13), y se han utilizado repetidamente como referencia para establecer modelos en ratones de drogas y alimentos (3, 6).

Un problema principal en el tratamiento de la adicción son las altas tasas de recaída en el consumo de drogas después de períodos de abstinencia. Una ventaja importante de nuestro modelo de adicción a los cannabinoides es la posibilidad de evaluar dos parámetros estrechamente relacionados con el deseo y la recaída, la resistencia a la extinción y el restablecimiento inducido por señales. La resistencia a la extinción mide un comportamiento de "explosión de extinción" típicamente visto en roedores durante el primer día de extinción que se ha revelado con diferentes drogas de abuso. La resistencia a extinguir el comportamiento operante revelado en el presente estudio sugiere que los ratones habían desarrollado un comportamiento de autoadministración de WIN 55,212-2 operante confiable y persistente, y se ha informado que este comportamiento refleja un estado de "ansia" al comienzo del entrenamiento de extinción. Se ha sugerido que el deseo durante la abstinencia está directamente relacionado con la vulnerabilidad a la recaída. El restablecimiento de la búsqueda de drogas generalmente se evalúa mediante el modelo de extinción-restablecimiento de la conducta de búsqueda de la droga y la respuesta no reforzada en el agujero activo previamente aprendido es la medida de la búsqueda de drogas. En nuestro modelo, realizamos un procedimiento de restablecimiento inducido por señales después de la extinción, en el que la reexposición a las condiciones de las señales mencionadas al responder al agujero activo, señales que se habían emparejado contingentemente con la entrega de drogas durante la adquisición, restablecieron la búsqueda de drogas. La exposición a señales asociadas con las drogas puede provocar el deseo y la búsqueda de drogas, efectos implicados tanto en el mantenimiento del consumo continuo de drogas como en la inducción de la búsqueda de drogas después de la abstinencia, lo que muestra una importante resistencia a la extinción. Sin embargo, algunos estudios argumentan que la abstinencia humana suele ser forzada o voluntaria (autoimpuesta). De hecho, la recaída y el ansia de consumir drogas comúnmente se desencadenan no solo por las señales asociadas con la droga, sino también por la exposición aguda a la droga autoadministrada, el estrés y los síntomas de abstinencia a corto o prolongado tiempo. Se han desarrollado modelos animales alternativos en los que la abstinencia no se obtiene mediante el entrenamiento de extinción, sino a través de la abstinencia forzada, evaluada principalmente por el modelo de incubación del ansia de drogas o por la abstinencia voluntaria, lograda mediante la introducción de consecuencias negativas a la administración continua de drogas, o de refuerzos alternativos no farmacológicos.

Este modelo también evalúa dos rasgos fenotípicos relacionados con factores de vulnerabilidad a la adicción. La impulsividad es un constructo complejo compuesto por impulsividad motora e impulsividad de elección. En nuestro modelo, hemos considerado los toques de nariz activos no reforzados durante los períodos de tiempo fuera para evaluar la impulsividad motora definida como desinhibición motora, como se describió previamente (14). El rasgo de impulsividad ha sido asociado con la adicción a las drogas ya que predice la transición a la ingesta compulsiva de drogas, y los correlatos neurobiológicos subyacentes a este rasgo fenotípico podrían revelar biomarcadores potenciales y/o dianas terapéuticas para la adicción a los cannabinoides. La sensibilidad a la recompensa se asocia con una



mayor probabilidad de responder con un componente hedónico positivo que involucra vías que tienen un papel crucial en las propiedades gratificantes de las drogas de abuso (15).

Hemos utilizado este modelo de adicción a cannabinoides para evaluar la posible implicación de la vía glutamatérgica PL-NAC, que juega un papel crucial en la adicción a la comida (6). Esta vía está modulada por el sistema endocannabinoide y la deleción del CB1R de estas neuronas glutamatérgicas conduce a un fenotipo resiliente para desarrollar adicción a la comida (6). Los CB1R son los principales receptores de cannabinoides implicados en el desarrollo de la adicción a los cannabinoides (12) y la inhibición de la actividad de la vía PL-NAC puede modificar el desarrollo de la adicción a los cannabinoides. Sin embargo, la activación de CNO de los DREADD inhibitorios expresados en la vía PL-NAC no alteró el comportamiento adictivo con respecto a los criterios adictivos y los rasgos de vulnerabilidad fenotípica. Sin embargo, la resistencia a la extinción disminuyó en los animales tratados con CNO, lo que sugiere un efecto protector de esta manipulación en el estado de ansia. Es importante subrayar que la permeabilidad de los catéteres limitó el protocolo a dos semanas. Por lo tanto, el tiempo entre el implante de las minibombas llenas de CNO y la realización de las pruebas de comportamiento de tipo adictivo fue de solo 15 días. Por lo tanto, el CNO solo tuvo este corto período de tiempo para liberarse de la minibomba y actuar sobre el DREADD para inhibir la vía. Presumimos que esta es la razón de la ausencia del efecto de inhibición de esta vía, ya que la acción a largo plazo de CNO y hM4Di DREADDs en la inhibición de una vía neuronal ha sido confirmada en muchos estudios (5, 6).

La influencia del entorno es clave tanto en el inicio del consumo como en el mantenimiento de la adicción a los cannabinoides. De hecho, los entornos con altos niveles de estresores sociales, falta de oportunidades, fácil acceso a las drogas y falta de refuerzos alternativos conducen a un riesgo elevado de desarrollo de adicciones. En consecuencia, el mayor defecto de este modelo es la ausencia del aspecto ambiental del trastorno, que no podemos imitar en un modelo de ratón.

Hemos establecido por primera vez un modelo de ratón novedoso y confiable de adicción a cannabinoides utilizando WIN 55,212-2 iv autoadministración operante que permite evaluar tres criterios de adicción, persistencia de respuesta, motivación y compulsividad, en función de las características de adicción definidas en El DSM-5. Este modelo también permite medir dos parámetros relacionados con el craving, la resistencia a la extinción y el restablecimiento, y dos rasgos fenotípicos relacionados con la adicción a los cannabinoides, la impulsividad y la sensibilidad a la recompensa. Este modelo representa una herramienta fundamental para dilucidar los sustratos neurobiológicos de la adicción a los cannabinoides y guiar futuras investigaciones hacia estrategias terapéuticas para abordar este trastorno.

A continuación en este proyecto, evaluamos los efectos de la exposición al THC durante la adolescencia sobre la vulnerabilidad a desarrollar un comportamiento similar a la adicción al cannabis y las alteraciones conductuales relacionadas en la edad adulta mediante el uso de un modelo de ratón de autoadministración WIN 55,212-2. Descubrimos que la exposición crónica al THC desde el PND 37 al 57 aumentó la impulsividad en ratones adultos, que fue más pronunciada en el subgrupo de ratones que desarrollaron los criterios similares a la adicción. Además, el tratamiento con THC durante la adolescencia aumentó el porcentaje de ratones altamente impulsivos y favoreció el refuerzo de WIN 55,212-2 en este grupo. Además, los ratones altamente impulsivos pretratados con THC presentaron una mayor sensibilidad a la recompensa en comparación con los ratones poco impulsivos pretratados con THC, así como con los ratones altamente impulsivos pretratados con



---

vehículo. Inversamente, la exposición previa a THC durante la adolescencia disminuyó la resistencia a extinguir el comportamiento operante.

La impulsividad es un constructo complejo definido como una “predisposición hacia reacciones rápidas e imprevistas ante estímulos internos y externos sin tener en cuenta las consecuencias negativas de estas reacciones para ellos mismos o para los demás” que se compone de impulsividad motora y de elección. La impulsividad motora se describe como la incapacidad para inhibir el comportamiento cambiando el curso de acción o para detener una respuesta una vez que se inicia. Hemos definido la impulsividad motora como las respuestas al agujero activo no reforzados durante los tiempos de espera que reflejan la desinhibición motora, como se describió previamente en nuestro laboratorio. La compulsividad tiene sus raíces en los signos asociados al trastorno obsesivo-compulsivo y puede comprender conductas repetitivas ante las consecuencias adversas tras la pérdida de control. Como tal, implementamos una prueba de comportamiento basada en el castigo donde la perseverancia en responder a pesar del castigo definió el comportamiento compulsivo. Finalmente, la sensibilidad a la recompensa representa la tendencia de los individuos a acercarse a un reforzador positivo. En este proyecto, se define operativamente como la media de las infusiones obtenidas durante las últimas tres sesiones de entrenamiento operante.

El tratamiento previo con  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol durante la adolescencia aumentó la impulsividad en la edad adulta. Aunque el comportamiento impulsivo puede ser un rasgo preexistente que promueve el uso de drogas, el consumo agudo y crónico de cannabis puede resultar en cambios de comportamiento, incluidos aumentos en la impulsividad, lo que puede facilitar un mayor uso de drogas o la transición al uso de otras drogas de abuso según la teoría de la puerta de enlace. En humanos, el consumo de marihuana se ha asociado con una mayor impulsividad cuando se administra de manera aguda o crónica. Al mismo tiempo, se ha demostrado que las personas con CUD presentan una mayor impulsividad. Curiosamente, se sugiere que la impulsividad predispone a la compulsividad, lo que conduce al abuso de drogas y la adicción. De hecho, se ha demostrado que la alta impulsividad predice la transición de consumo de cocaína controlado a compulsivo en ratas, ya que las ratas altamente impulsivas mostraron una mayor resistencia al castigo de la respuesta de consumo de cocaína en comparación con las ratas poco impulsivas, mientras que un análisis de correlación reveló, en el nivel de la población, que la impulsividad predice la compulsividad. La compulsividad comparte similitudes con la impulsividad en la disfunción del control inhibitorio, que se relaciona con alteraciones en las redes de mPFC en las regiones subcorticales. Sin embargo, la impulsividad y la compulsividad pueden estar en un continuo, siendo la compulsividad repetitiva y perseverante. En nuestro estudio, el pretratamiento con THC durante la adolescencia no aumentó el porcentaje de ratones que alcanzaron los criterios de adicción a los cannabinoides, pero aumentó los niveles de comportamiento similar a la impulsividad. Además, dentro de este grupo, los ratones “adictos” mostraron los valores más altos de impulsividad motora en comparación con el resto de los grupos. Este resultado destaca que la interacción entre la exposición de los adolescentes al THC y la impulsividad en el desarrollo de la adicción debe explorarse más a fondo.

Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones que sugieren una sobrerrepresentación de individuos altamente impulsivos con trastornos por abuso de sustancias y una alta comorbilidad entre el comportamiento impulsivo y el abuso de sustancias. De hecho, el desarrollo de la adicción a las drogas representaría una progresión

---



desde la impulsividad inicial mediada por el NAc hasta una respuesta compulsiva y habitual, una característica distintiva de la adicción. En consecuencia, en nuestro estudio, el análisis PCA separó los constructos de impulsividad de la compulsividad y la sensibilidad a la recompensa de la resistencia a la extinción, distinguiendo los dos extremos en el desarrollo continuo del trastorno entre la etapa temprana de inicio y la etapa tardía de establecimiento. En consecuencia, la exposición al THC durante la adolescencia puede aumentar la vulnerabilidad a desarrollar adicción al cannabis al aumentar la impulsividad.

Los ratones altamente impulsivos pretratados con THC obtuvieron más refuerzos durante las sesiones de condicionamiento operante que los ratones tratados con vehículo, lo que sugiere un aumento de los efectos de refuerzo de WIN 55,212-2. I

En la misma línea, también se informó que la adquisición de la autoadministración de WIN 55,212-2 mejoró en ratas después de la exposición al THC en la adolescencia, lo que sugiere una mayor sensibilidad a los efectos de refuerzo de los agonistas cannabinoides en la edad adulta. Sin embargo, las relaciones entre este cambio y el comportamiento impulsivo no fueron evaluadas en este estudio previo. Además, en nuestro estudio, el pretratamiento con THC aumentó la sensibilidad de recompensa a WIN 55,212-2 en ratones altamente impulsivos. Se ha documentado que un historial de exposición a cannabinoides en animales adolescentes puede aumentar la sensibilidad a otras drogas de abuso, ya que la experiencia hedónica positiva generada por estas exposiciones tempranas a cannabinoides puede alterar las vías dopaminérgicas mesocorticolímbicas, aumentando la probabilidad posterior de responder a otras drogas de abuso. Por lo tanto, comprender los mecanismos del consumo de cannabis en adolescentes es fundamental para la prevención del consumo de drogas, teniendo en cuenta que varios autores han sugerido una controvertida teoría de la puerta de entrada que propone que los consumidores de cannabis hagan una transición gradual hacia el consumo de drogas más adictivas. Sin embargo, se requiere más investigación, ya que en las últimas décadas se han debatido otras explicaciones contrapuestas de la asociación entre el consumo de cannabis y el uso de otras drogas ilícitas.

El tratamiento con THC durante la adolescencia disminuyó la resistencia a la extinción del comportamiento de autoadministración de WIN 55,212-2. La resistencia a la extinción se puede observar como un comportamiento de "explosión de extinción" que se observa típicamente en roedores durante el primer día de extinción, que se informa que refleja un estado "ansioso" directamente relacionado con el vulnerabilidad a la recaída después de la abstinencia. El sistema eCB juega un papel central en la regulación del aprendizaje y la memoria y el tratamiento con THC durante la adolescencia podría alterar los procesos de memoria, lo que lleva a esta falta de explosión de extinción que refleja la fuerza del comportamiento operante previamente adquirido. Diversos estudios han demostrado el impacto nocivo del abuso de THC durante la adolescencia en la función de la memoria en la edad adulta en ratones y ratas. También se han revelado déficits cognitivos en consumidores humanos de cannabis después del consumo crónico de cannabis, asociados con la activación sostenida de CB1R, particularmente en la memoria de trabajo y la flexibilidad cognitiva. Es posible que estos déficits cognitivos puedan haber explicado las diferencias en la resistencia a la extinción y la impulsividad encontradas en ratones pretratados con THC.

El tratamiento con THC durante la adolescencia produjo una regulación a la baja en la expresión del gen *drd2* en la NAc. Esto está de acuerdo con estudios previos en consumidores crónicos de cannabis que mostraron una reactividad cerebral atenuada a las



drogas estimulantes liberadoras de dopamina en el cuerpo estriado, donde las respuestas de dopamina medidas con PET y [11C] raclopride en el NAc se correlacionaron inversamente con la adicción. severidad y deseo. Este patrón también se muestra en el uso crónico de otras drogas de abuso, como en pacientes humanos adictos a la cocaína, donde se informó una regulación a la baja del receptor de dopamina D2 (D2R) en el NAc después de la exposición repetida a la droga, que no se ha revelado hasta la fecha en consumidores de cannabis. La expresión reducida de D2R en el cuerpo estriado se ha relacionado con una mayor impulsividad. Además, la baja disponibilidad de D2R en el cuerpo estriado predice niveles subsiguientes de autoadministración de cocaína en monos rhesus y consumidores humanos de cocaína. Sugerimos que la exposición de adolescentes a THC en nuestro estudio promovió un comportamiento similar a la impulsividad en la edad adulta a través de la regulación a la baja de la expresión de *drd2* en el NAc. El sistema de la dopamina ejerce diferentes roles en el refuerzo, la motivación y la autorregulación, lo que conduce a una expresión aumentada y disminuida de los receptores de dopamina a medida que se desarrolla la adicción. Las futuras líneas de investigación deberían evaluar si el rasgo de impulsividad es anterior al inicio del consumo de cannabis o si el consumo de cannabis durante la adolescencia produce alteraciones en el cerebro.

También se observa una regulación a la baja del gen *adora2a* en la NAc de ratones expuestos a THC durante la adolescencia. Los receptores de adenosina A2A (A2AR) participan en el control de las propiedades gratificantes y motivacionales de las drogas. De acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado la participación específica del A2AR en las propiedades adictivas del THC. Además, la autoadministración de metanfetamina durante 14 días en ratas disminuyó el A2AR en el caparazón accumbens, mientras que se informó que la estimulación de A2AR disminuyó la autoadministración de drogas, principalmente a través de la formación de un heterómero con el D2R.

El gen *drd2* también está regulado a la baja en el mPFC de ratones "adictos" pretratados con vehículo en comparación con los "no adictos". En consonancia, se encontró una disminución en la expresión de *drd2* en el mPFC de ratones adictos tratados crónicamente con cocaína. Esta regulación a la baja del gen *drd2* en el mPFC respalda aún más el fenotipo impulsivo revelado en ratones "adictos".

El pretratamiento con THC reguló a la baja el gen *drd2* en el HPC. En consecuencia, la regulación negativa inducida por la cocaína de D2R en el HPC promueve la plasticidad que favorece los comportamientos de preferencia de lugar condicionados. La regulación a la baja observada en nuestro estudio después del THC durante la adolescencia podría alterar los procesos de memoria a corto y largo plazo necesarios para el desarrollo de un comportamiento similar al de la adicción al cannabis en la edad adulta. El gen *adora2a* también se reguló a la baja en el HPC, de acuerdo con la literatura que indica que los déficits de la función A2AR promueven el comportamiento impulsivo relacionado con las modificaciones del HPC. Finalmente, no se encontraron cambios en la expresión del gen *cnr1* en ninguna de las cuatro áreas del cerebro evaluadas, lo que sugiere que cualquier posible cambio en la expresión de CB1R promovida por la exposición al THC durante la adolescencia podría ser transitoria.

En este estudio se eligió el sexo masculino considerando la literatura previa sobre modelos de adicción a las drogas. Teniendo en cuenta todos estos estudios realizados anteriormente en roedores machos, la investigación adicional ahora debería centrarse en las diferencias sexuales potenciales en la propensión de la exposición de los adolescentes al THC para aumentar la sensibilidad a otras drogas de abuso.



En resumen, este estudio reveló que la exposición al THC durante la adolescencia promovió la impulsividad en la edad adulta, aumentó el refuerzo de WIN 55,212-2 y favoreció la sensibilidad a la recompensa en ratones altamente impulsivos, y disminuyó la resistencia a la extinción. Los cambios de comportamiento promovidos por la exposición de los adolescentes a THC se asociaron con la regulación a la baja de la expresión de *drd2* y *adora2a* en NAc y HPC, lo que puede estar estrechamente relacionado con los cambios revelados en el comportamiento impulsivo. Estos cambios neuroquímicos y de comportamiento revelan consecuencias duraderas provocadas por la exposición al THC durante la adolescencia y enfatizan aún más las posibles consecuencias negativas relacionadas con el consumo temprano de cannabis.

Por último, realizamos la sobreexpresión de D2R en la vía central de PL-NAc (Fig. 28), los ratones siguieron el mismo procedimiento quirúrgico y de comportamiento con un enfoque de doble vector similar al descrito en el experimento anterior con ligeras modificaciones: (1) AAV-D2R o AAV- control se inyectó en el PL, (2) no se requirió la intervención quirúrgica para la minibomba osmótica llena de CNO, y (3) se realizó un ensayo de inmunofluorescencia después de la perfusión de los ratones usando un anticuerpo anti-D2R y anti-GFP que visualice los D2R sobreexpresados y el reportero mVenus del AAV inyectado en PL y contra la recombinasa Cre para visualizar el sitio de inyección del AAV retrógrado en el núcleo de NAc y el transporte retrógrado al PL. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de DR2 de las neuronas de proyección del PL mPFC al NAc producía un comportamiento compulsivo a pesar de las consecuencias perjudiciales. Esta manipulación solo afectó al criterio de adicción compulsiva, aunque el resultado no fue significativo. Es importante destacar que un subconjunto del 60 % de los ratones manipulados que sobreexpresaban el receptor D2 de la dopamina cumplían los criterios de adicción al cannabis. Este porcentaje es significativamente superior al obtenido por el grupo control que es de un 25%.

En resumen, pudimos identificar que el aumento de la expresión del receptor de dopamina D2 en la vía mPFC-NAc promueve el fenotipo similar a la adicción al cannabis. Nuestro estudio revela un nuevo mecanismo neurobiológico subyacente a la resiliencia y la vulnerabilidad al desarrollo de la adicción al cannabis, que podría allanar el camino hacia intervenciones novedosas y eficientes para este trastorno.

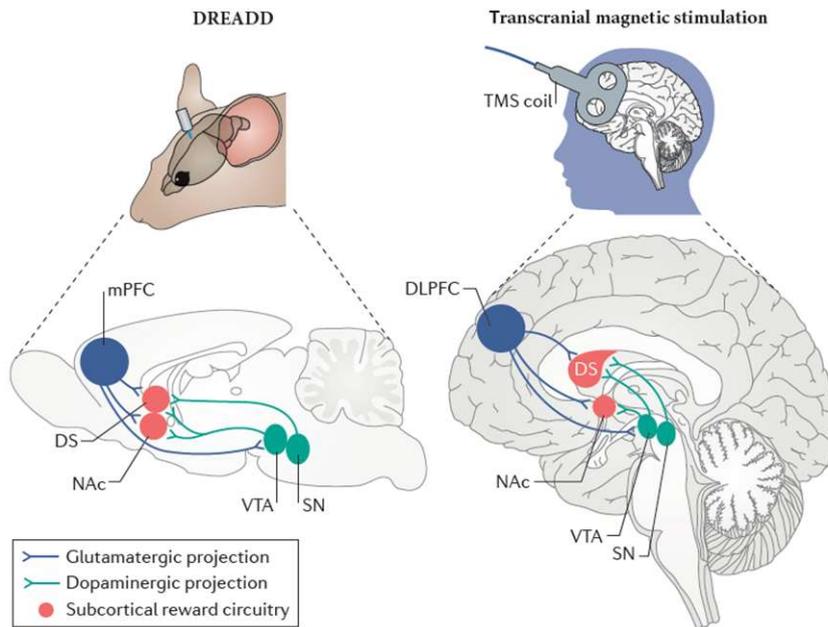
Estos estudios nos proporcionan herramientas muy valiosas para continuar con el estudio de las bases neurobiológicas de la vulnerabilidad y la resiliencia a la adicción al cannabis. Actualmente estamos preparando un ensayo clínico en colaboración con el grupo de investigación liderado por Antoni Gual del Hospital Clínic para el estudio de los efectos de la estimulación transcraneal en el córtex dorso lateral de voluntarios consumidores de cannabis en los efectos preventivos del craving y la recaída en el consumo de esta droga.

Estudios futuros nos permitirán seguir investigando las bases neurobiológicas de la resiliencia y la vulnerabilidad a la adicción al cannabis. Comprender los mecanismos subyacentes nos ayudará a prevenir la transición del consumo controlado a la pérdida de control sobre el consumo de cannabis en la adolescencia, etapa vulnerable desde el punto de vista madurativo.

#### **APLICABILIDAD E IMPACTO SOCIO-SANITARIO DEL PROYECTO:**

Estos estudios nos proporcionan herramientas muy valiosas para continuar con el estudio de las bases neurobiológicas de la vulnerabilidad y la resiliencia a la adicción al cannabis. Actualmente estamos preparando un ensayo clínico en colaboración con el grupo de

investigación liderado por Antoni Gual del Hospital Clínic para el estudio de los efectos de la estimulación transcraneal en el córtex dorso lateral de voluntarios consumidores de cannabis en los efectos preventivos del craving y la recaída en el consumo de esta droga (Figura 13).



**Figura 13. Esquema representativo de la aplicación de la estrategia viral en ratón y la estimulación magnética transcraneal en humanos.** Se observa el equivalente del prelimbic mPFC y el corte dorso lateral en ratón y humanos respectivamente. (Extraído de Diana et al. 2017).

En nuestro estudio futuro, utilizaremos el protocolo DLPFC-rTMS y reclutaremos un total de 30 personas para lograr resultados significativos y evaluar el efecto terapéutico de la estimulación de rTMS en personas con CUD. El objetivo principal del estudio es reducir el uso y el deseo provocados por señales en individuos con CUD mediante la estimulación de rTMS en la corteza prefrontal dorsolateral izquierda. Con este estudio pretendemos proporcionar una contribución mayor en la prevención y tratamiento de los trastornos adictivos.

#### **SÍNTESIS DE LOS ASPECTOS MÁS RELEVANTES QUE APORTA EL ESTUDIO:**

Hemos establecido por primera vez un modelo de ratón de adicción a los cannabinoides mediante la autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 (0,0125 mg/kg/infusión) en ratones C57Bl/6J. Este modelo permite evaluar los criterios de adicción agrupándolos en 1) persistencia de respuesta durante un período de no disponibilidad de la droga, 2) motivación para WIN 55,212-2 con una relación progresiva, y 3) compulsividad cuando la recompensa está asociada con un castigo como una descarga eléctrica en las patas, de acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales 5ª edición (DSM-5). Este modelo también permite medir dos parámetros que se han relacionado con los criterios diagnósticos del DSM-5 de craving, resistencia a la extinción y la recaída, y dos rasgos fenotípicos sugeridos como factores predisponentes, la impulsividad y la sensibilidad a la recompensa. Encontramos que el 35,6% de los ratones desarrollaron los criterios de adicción a los cannabinoides, lo que permitió diferenciar entre ratones resistentes y



---

vulnerables. Por lo tanto, hemos establecido un modelo novedoso y confiable para estudiar los correlatos neurobiológicos que subyacen a la resiliencia o vulnerabilidad para desarrollar adicción a los cannabinoides. Este modelo incluía la inhibición quimiogénica de la actividad neuronal en la corteza prefrontal medial a la vía del núcleo accumbens para evaluar el sustrato neurobiológico de la adicción a los cannabinoides. Este modelo arrojará luz sobre el sustrato neurobiológico subyacente a la adicción a los cannabinoides.

La adicción al cannabis es un trastorno con recaídas crónicas que carece de un tratamiento eficaz. El consumo regular de cannabis generalmente comienza durante la adolescencia, y esta exposición temprana a los cannabinoides puede aumentar el riesgo de adicción a las drogas en la edad adulta. Este estudio investiga el desarrollo de un comportamiento similar a la adicción al cannabis en ratones adultos después de la exposición de los adolescentes al principal componente psicoactivo del cannabis,  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC).

Se expuso a ratones machos adolescentes a 5 mg/kg de THC desde el día 37 al 57 después del nacimiento. Se realizaron sesiones de autoadministración operativa de WIN 55,212-2 (12,5  $\mu$ g/kg/infusión) durante 10 días. Los ratones fueron evaluados en los tres criterios similares a la adicción (persistencia de la respuesta, motivación y compulsividad), dos parámetros relacionados con el ansia (resistencia a la extinción y comportamiento de búsqueda de drogas) y dos rasgos de vulnerabilidad fenotípica relacionados con los trastornos por uso de sustancias (impulsividad y sensibilidad a la recompensa). Además, se realizaron ensayos de qPCR para detectar genes expresados diferencialmente en la corteza prefrontal medial (mPFC), el núcleo accumbens (NAc), el cuerpo estriado dorsal y el hipocampo (HPC) de ratones "adictos" y "no adictos".

La exposición de los adolescentes a THC no modificó el refuerzo de WIN 55,212-2 ni el desarrollo de un comportamiento similar al de la adicción al cannabis. A la inversa, los ratones preexposados a THC mostraron un comportamiento impulsivo en la edad adulta, que fue más pronunciado en el subgrupo de ratones que desarrollaron los criterios similares a la adicción. Además, se reveló una regulación negativa de la expresión génica de *drd2* y *adora2a* en NAc y HPC en ratones preexposados a THC, así como una regulación negativa de la expresión de *drd2* en mPFC de ratones pretratados con vehículo que desarrollaron comportamientos similares a los de la adicción.

Estos hallazgos sugieren que la exposición de los adolescentes a THC puede promover un comportamiento similar a la impulsividad en la edad adulta, asociado con la expresión disminuida de *drd2* y *adora2a* en NAc y HPC.

#### **ENLACES O REFERENCIAS PARA AMPLIAR INFORMACIÓN ACERCA DEL PROYECTO (en su caso):**

Cajiao-Manrique MDM, Maldonado R, Martín-García E. A male mouse model of WIN 55,212-2 self-administration to study cannabinoid addiction. *Front Pharmacol.* 2023 Mar 27;14:1143365. doi: 10.3389/fphar.2023.1143365. eCollection 2023. PMID: 37050910 Free PMC article.

María del Mar Cajiao-Manrique, Verònica Casadó, Alejandra García-Blanco, Rafael Maldonado, Elena Martín-García. THC exposure during adolescence increases impulsivity-like behavior in adulthood in a WIN 55,212-2 self-administration mouse model. 2023 *Frontiers in Psychiatry, section Psychopharmacology.*



**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS GENERADAS (4) (SI NO LO HA HECHO, LE ROGAMOS ENVÍE JUNTO CON ESTA FICHA COPIA DE CADA UNO DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS)**

Research Papers

Azua, I.R. De\*, Martin-Garcia, E.\* , Domingo-rodriguez, L., Rey, A.A., Cuadrado, D.P., 2021. Cannabinoid CB1 receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons drives overconsumption of palatable food and obesity. *Neuropsychopharmacology*. Apr;46(5):982-991. doi: 10.1038/s41386-021-00957-z. Epub 2021 Feb 8.

Cabana-Domínguez J.\*, Martín-García E.\*, Gallego-Roman A., Maldonado R.#, Fernàndez-Castillo N.# and Cormand B.#, 2021. Plcb1 haploinsufficiency results in decreased cocaine relapse-related phenotype in mice. *Translational Psychiatry*. Oct 11;11(1):521. doi: 10.1038/s41398-021-01396-6.

Domingo-Rodríguez L.\*, Cabana-Domínguez J.\*, Fernàndez-Castillo N., Cormand B., Martín-García E.#, Maldonado R.#, 2022. Differential expression of miRNA between vulnerable and resilient cocaine addiction-like phenotypes. *Addiction Biology Sep;27(5):e13201*. doi: 10.1111/adb.13201.

Forget B., Godino A., Martin Garcia E., Domingo-Rodríguez L., Vincent Kappes V., Pierre Poirier P., Andrianarivelo A., Vanhoutte P., Girault J.A., Maldonado R., and Caboche J., 2021. Cell type- and region-specific modulation of cocaine seeking by micro-RNA-1 in striatal projection neurons. *Molecular Psychiatry*. Nov 16. doi: 10.1038/s41380-021-01328-2.

Navandar M., Martín-García E., Maldonado R., Lutz B., Gerber S., Ruiz de Azua I. 2021 Common pathways confer vulnerability versus resilience 1 to food and cocaine addiction-like behavior. *Scientific Reports* 2021 Apr 27;11(1):9076. doi: 10.1038/s41598-021-88363-9.

García-Blanco A., Domingo-Rodríguez L., Cabana-Domínguez J., Fernàndez-Castillo N., Pineda-Cirera L., Mayneris-Perxachs J., Burokas A., Espinosa-Carrasco J., Arboleya S., Latorre J., Stanton C., Cormand B., Fernández-Real JM.,\* Martín-García M.\*, Maldonado R.\* 2022. MicroRNAs signatures associated with vulnerability to food addiction in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* May 16;132(10):e156281. doi: 10.1172/JCI156281.

García-Blanco A, Ramírez-López Á, Navarrete F, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Martín-García E, Maldonado R. Role of CB2 cannabinoid receptor in the development of food addiction in male mice. *Neurobiol Dis*. 2023 Apr;179:106034. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106034. Epub 2023 Feb 10. PMID: 36775043

Cajiao-Manrique MDM, Maldonado R, Martín-García E. A male mouse model of WIN 55,212-2 self-administration to study cannabinoid addiction. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 27;14:1143365. doi: 10.3389/fphar.2023.1143365. eCollection 2023. PMID: 37050910 Free PMC article.

María del Mar Cajiao-Manrique, Verónica Casadó, Alejandra García-Blanco, Rafael Maldonado, Elena Martín-García. THC exposure during adolescence increases impulsivity-like behavior in adulthood in a WIN 55,212-2 self-administration mouse model. 2023



---

Frontiers in Psychiatry, section Psychopharmacology.

### Reviews

Martín-García, E., Domingo-Rodríguez, L., Maldonado, R., 2020. An Operant Conditioning Model Combined with a Chemogenetic Approach to Study the Neurobiology of Food Addiction in Mice. *Bio-Protocol* 2020 Oct 5;10(19):e3777.

Maldonado, R., Cabañero, D., Martín-García, E., 2020. The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* Sep;22(3):229-239.

Maldonado, R., Calvé, P., García-Blanco, A., Domingo-Rodríguez, L., Senabre, E., Martín-García, E., 2021. Vulnerability to addiction. *Neuropharmacology* 186, 108466.

Maldonado R., Domingo-Rodríguez L., Senabre E., Calvé P., García-Blanco A., Martín-García E., 2020. Genomics and epigenomics of addiction. *American Journal of Medical Genetics* Apr;186(3):128-139.

Cabañero D, Martín-García E, Maldonado R. 2021. The CB2 cannabinoid receptor as a therapeutic target in the central nervous system. *Expert Opin Ther Targets.* 2021 Aug;25(8):659-676. doi: 10.1080/14728222.2021.1971196. Epub 2021 Sep 23.

Maldonado R, Cabañero D, Martín-García E. The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress. 2020. *Dialogues Clin Neurosci.* 2020 Sep;22(3):229-239. doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/rmaldonado.

### PRESENTACIÓN DE RESULTADOS (CONGRESOS, JORNADAS Y ACTIVIDADES DE DISEMINACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA):

-Asistencia a congreso con presentación oral (premio artículo científico en la categoría postdoctoral) y póster en la 21ª REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN SOBRE CANNABINOIDES, MÁLAGA, 25 – 27 noviembre 2021 Título: NEUROBIOLOGICAL MECHANISMS UNDERLYING VULNERABILITY AND RESILIENCE TO CANNABIS ADDICTION. Autores: Martín-García E, Cajiao M, Casado-Anguera V, García-Blanco A, Senabre E, Maldonado R.

-Asistencia a la 22a Reunión Anual Sociedad Española De Investigación Sobre Cannabinoides, Pamplona (24-26/11/2022) y presentación de póster “Neurobiological mechanisms underlying vulnerability and resilience to cannabis addiction”.

-Asistencia al 32nd Annual International Cannabinoid Research Society Symposium on the Cannabinoids (ICRS), Galway (Irlanda)(25-30/06/2022) y presentación de resultados del proyecto en póster titulado “Neurobiological mechanisms underlying vulnerability and resilience to cannabis addiction”

-Asistencia al MPA 2022 Molecular Psychiatry Meeting (06-08/03/2022) y presentación de resultados del proyecto en póster “Neurobiological mechanisms underlying vulnerability and resilience to cannabis addiction”.

-Asistencia al WADD, VI World Congress on Dual Disorders, Méjico (20-24/06/2022) y presentación de póster “miRNA SIGNATURES OF VULNERABILITY TO FOOD ADDICTION IN MICE”.



---

-Asistencia a las XLIX Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol y al VIII Congreso Nacional de Patología Bio-Psicosocial, Santa Cruz de Tenerife (6-8/10/2022)-

El plan de difusión de los resultados producidos durante el transcurso del proyecto del PNSD ha tenido un triple objetivo:

El primer bloque consistió en presentar los resultados de investigación obtenidos para la comunidad científica y estudiantes académicos:

- Publicación en revistas científicas (preferiblemente de alto impacto).
- Organizar y asistir a seminarios y congresos científicos.
- Sitios web científicos, foros comunitarios, eventos locales.
- Cursos sobre neurociencia y neurofarmacología con estudiantes de medicina de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona.
- Cursos de verano para estudiantes de grado en la Universidad Autónoma de Barcelona How the Brain Works - Universitat Autònoma de Barcelona - UAB Barcelona.
- Colaboraciones con JOve para difundir nuestros métodos experimentales JoVE | Lista de reproducción -Escuela de verano Cómo funciona el cerebro\_UAB.
- Escuela de verano con alumnos de bachillerato en los cursos de verano de la Universitat Pompeu Fabra (UPF).

**PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD (en su caso) :**

Se intentarán patentes futuras después de hacer el ensayo clínico.

**BIBLIOGRAFÍA (4):**

1. E. Martín-García, M. F. Barbano, L. Galeote, R. Maldonado, New operant model of nicotine-seeking behaviour in mice. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* **12**, 343–356 (2009).
2. M. Vallee, S. Vitiello, L. Bellocchio, E. Hebert-Chatelain, S. Monlezun, E. Martín-García, F. Kasanetz, G. L. Baillie, F. Panin, A. Cathala, V. Roullot-Lacarrière, S. Fabre, D. P. Hurst, D. L. Lynch, D. M. Shore, V. Roche-Gamonet, U. Spampinato, J. M. Revest, R. Maldonado, P. H. Reggio, R. A. Ross, G. Marsicano, P. V. Piazza, Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication. *Science.* **343**, 94–98 (2014).
3. E. Martín-García, L. Bourgoïn, A. Cathala, F. Kasanetz, M. Mondesir, A. Gutiérrez-Rodríguez, L. Reguero, J. F. Fiancette, P. Grandes, U. Spampinato, R. Maldonado, P. V. Piazza, G. Marsicano, V. Deroche-Gamonet, Differential control of cocaine self-administration by GABAergic and glutamatergic CB1 cannabinoid receptors. *Neuropsychopharmacology.* **41**, 2192–2205 (2016).
4. K. B. J. Paxinos, G. and Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, San Diego, 2nd Editio., 2001).
5. E. Martín-García, L. Domingo-Rodríguez, R. Maldonado, An Operant Conditioning Model Combined with a Chemogenetic Approach to Study the Neurobiology of Food Addiction in Mice. *Bio-Protocol.* **10**, 1–23 (2020).



6. L. Domingo-Rodríguez, I. Ruiz de Azua, E. Dominguez, E. Senabre, I. Serra, S. Kummer, M. Navandar, S. Baddenhausen, C. Hofmann, R. Andero, S. Gerber, M. Navarrete, M. Dierssen, B. Lutz, E. Martín-García, R. Maldonado, A specific prelimbic-nucleus accumbens pathway controls resilience versus vulnerability to food addiction. *Nat. Commun.* **11**, 1–16 (2020).
7. M. Scherma, C. Dessì, A. L. Muntoni, S. Lecca, V. Satta, A. Luchicchi, M. Pistis, L. V. Panlilio, L. Fattore, S. R. Goldberg, W. Fratta, P. Fadda, Adolescent  $\Delta$  9-Tetrahydrocannabinol Exposure Alters WIN55,212-2 Self-Administration in Adult Rats. *Neuropsychopharmacology*. **41**, 1416–1426 (2016).
8. C. Lüscher, The Emergence of a Circuit Model for Addiction. *Annu. Rev. Neurosci.* **39**, 257–276 (2016).
9. G. F. Koob, N. D. Volkow, Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*. **3**, 760–773 (2016).
10. M. Navandar, E. Martín-García, R. Maldonado, B. Lutz, S. Gerber, I. Ruiz de Azua, *Sci. Rep.*, in press.
11. G. Tanda, S. R. Goldberg, Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms—a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology (Berl)*. **169**, 115–134 (2003).
12. R. Maldonado, F. Berrendero, A. Ozaita, P. Robledo, Neurochemical basis of cannabis addiction. *Neuroscience* (2011), , doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.035.
13. V. Deroche-Gamonet, D. Belin, P. V Piazza, Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. **305**, 1014–1017 (2004).
14. L. Domingo-Rodríguez, J. Cabana-Domínguez, N. Fernandez-Castillo, B. Cormand, E. Martín-García, R. Maldonado, *Addict. Biol.*, in press.
15. N. D. Volkow, G. F. Koob, A. T. McLellan, Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N. Engl. J. Med.* **374**, 363–371 (2016).

**COFINANCIACIÓN (APARTE DE LA DELGACIÓN DEL GOBIERNO PARA EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS), en su caso:**

N/A

**AGRADECIMIENTOS:**

Queremos agradecer a todos y a cada uno de los miembros del laboratorio de Neurofarmacología de la Universidad Pompeu Fabra su participación en este proyecto. Al director del laboratorio, los investigadores seniors, los postdocs y los estudiantes de doctorado, a todas y a cada una de sus aportaciones. También agradecer al personal de administración de la UPF por su apoyo incondicional. Queremos agradecer también a M. Linares, R. Martín, D. Real y F. Porrón por su apoyo técnico. Un agradecimiento especial al PNSD por confiar en este proyecto y financiarlo. También a los colaboradores y co-autores de todos los trabajos publicados en este proyecto y en los anteriores que han servido de inspiración.



---

**CONTACTO (dirección de correo electrónico para consultas al equipo de investigación):**  
elena.martin@upf.edu

---

NOTAS:

(1): Este resumen está dirigido a dar a conocer los aspectos sustanciales de los proyectos financiados por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas tanto a la población general como a profesionales, a través de su publicación en la página web del Ministerio de Sanidad. Procure ser conciso en las exposiciones. Incluya las gráficas y tablas que considere oportunas. En el caso de precisar otro tipo de información (audiovisuales, archivos de datos, etc.), consulte con el órgano instructor para valorar procedimiento de difusión.

(2): Máximo 500 palabras.

(3): Utilice como fuente el Medical Subjects Headings, MeSH, del Index Medicus.

(4) Se recomienda seguir los Requisitos de Uniformidad del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas conforme a las normas de la US National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7250/>)