

UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y DE LA ALIMENTACIÓN



**ESTUDIO PROTEÓMICO DEL NÚCLEO
ACCUMBENS Y LA CORTEZA PREFRONTAL
DE RATAS CON DISTINTA VULNERABILIDAD
A LA ADICCIÓN A COCAÍNA Y MORFINA**

TESIS DOCTORAL

CARMEN DEL CASTILLO AGUADO

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y DE LA ALIMENTACIÓN



**ESTUDIO PROTEÓMICO DEL NÚCLEO
ACCUMBENS Y LA CORTEZA PREFRONTAL DE
RATAS CON DISTINTA VULNERABILIDAD A LA
ADICCIÓN A COCAÍNA Y MORFINA**

TESIS DOCTORAL

Memoria que presenta

CARMEN DEL CASTILLO AGUADO

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad CEU- San Pablo

Directoras:

Lidia Morales Goyanes y Carmen Pérez García

Madrid, 2010



CEU

*Universidad
San Pablo*

Dña. **Lidia Morales Goyanes**, profesora Adjunta del Departamento de CC Farmacéuticas y de la Alimentación y Dña. **Carmen Pérez García**, profesora Agregada del Departamento de CC Farmacéuticas y de la Alimentación de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU- San Pablo.

HACEN CONSTAR:

Que Dña. **Carmen del Castillo Aguado** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “ESTUDIO PROTEÓMICO DEL NÚCLEO ACCUMBENS Y LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATAS CON DISTINTA VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN A COCAÍNA Y MORFINA” con objeto de obtener el Grado de Doctor; y dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Madrid, a 14 de diciembre de 2010

Lidia Morales Goyanes

Carmen Pérez García

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto “Investigación de las bases biológicas de las conductas adictivas mediante estudios de expresión diferencial de genes y proteínas”, del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) 05/2503

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad CEU-San Pablo el haberme concedido una beca de investigación para poder realizar esta tesis doctoral y por haber puesto a mi disposición los medios materiales y técnicos necesarios para la realización de este trabajo.

A mis dos directoras de tesis, **Carmen Pérez** y **Lidia Morales**, tengo mucho que agradecer a nivel profesional, me habéis inculcado perfección, constancia y pensamiento científico; pero sobre todo me gustaría daros las gracias por vuestra ayuda a nivel personal, sois dos personas excelentes. Carmen, muchas gracias por ser tan voluntariosa y tan perfeccionista. Lidia, gracias por tu esfuerzo y tu precisión. A pesar de los obstáculos que nos han ido surgiendo, lo hemos conseguido porque creo que formamos un gran equipo. Habéis sido una gran ayuda en todos estos años y, sinceramente, si lo volviese a hacer me encantaría llevarlo a cabo con vosotras.

Cuando empecé la tesis doctoral recibí mucho apoyo por parte de **Luis Fernando** el “Jefe Supremo”. El hecho de haber llegado hasta aquí en gran parte ha sido por tenerme siempre presente en tus proyectos. Muchas gracias por todo.

De las cosas más reconfortantes de haber realizado este trabajo ha sido conocer a mis compañeros de laboratorio. Entre todos, conseguimos un ambiente de trabajo estupendo, en el que cualquier obstáculo se hacía un pelín más pequeño... A todos, muchas gracias por todos los días compartidos, por la ayuda, por las risas (que no han sido pocas), por estar en los momentos difíciles, en resumidas cuentas, por haber sido tan buenos amigos. **Nuria**, aunque llegaste más tarde al labo desde el primer día has sido una pieza clave en mi tesis. Gracias por tu amistad, por tu experiencia, por tantas horas compartidas y por haberme enseñado tantas cosas, a nivel profesional y a nivel personal: ¡¡¡¡mil gracias!!!! **Mª José**, hemos vivido el proceso de la tesis a la par pasando por lo mismo, compartiendo risas, sufrimientos, congresos... En este final también tienes que estar, claro. Muchas gracias por todo lo compartido. **Alberto**, te tengo que agradecer el haber sido tan buen amigo y compañero, tantas conversaciones, tantos buenos momentos y tantos comentarios tan acertados. Me has ayudado mucho en situaciones difíciles, muchas gracias. **Paula**, gracias por tantas charlas y por compartir conmigo tantas cosas de dentro y fuera del laboratorio; tengo un viaje a Brasil pendiente... **Esther**, mi hermana pequeña en la ciencia, gracias por tu alegría y optimismo y mucho ánimo que al final todo llega. **Elisabet**, qué de CPPs hemos compartido... Muchas gracias sobre todo por tu ayuda en la escritura estos últimos meses, sabes que cualquier apoyo es muy importante. **Rocío**, **Bea Merino**, **Marta**, **Ismael**, **Carla**, habéis sido unos compañeros

estupendos; gracias por el día a día, por el compañerismo, por los buenos y malos momentos, en resumidas cuentas, por todas las horas que hemos pasado juntos, dentro y fuera del labo. Sinceramente, creo que no habría podido realizar este trabajo en un ambiente mejor. Gracias también a mis compañeros de departamento **Carmen González, Gonzalo, Mariano, Consuelo, Antonio, Manolo, Bea Somoza y Mariví** por todos estos años compartidos.

También quiero agradecer a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, especialmente a **Lola**, el trabajo realizado durante estos años.

Cuando hice mi estancia en la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona, fui con bastante miedo a lo desconocido pero me encontré con una ciudad magnífica con gente estupenda que me trató fenomenal desde que el día llegué. **David**, muchas gracias por haberme permitido trabajar unos meses con vosotros y por ser siempre tan amable. **Eva, Cris y Carolina**, habéis sido “mi pequeña familia” en Barcelona. Sabéis que os tengo un cariño especial, ¡¡y tanto que sí!!

Como en todas las situaciones que requieren un mayor esfuerzo, durante la escritura de la tesis he podido darme cuenta de que existen personas que te apoyan incondicionalmente, que aunque ya era consciente de ello, una vez más me lo han vuelto a demostrar. Gracias a **mis padres** por haberme animado siempre a hacer lo que me gusta, por toda la ayuda prestada durante la escritura (los mimos, las comidas preparadas) y por valorar tanto tanto mi trabajo; sin vuestra ayuda habría sido todo mucho más complicado. A **Nacho** también le quiero agradecer los pequeños detalles que aunque no seas muy consciente de ellos, ayudan mucho. Ya os lo dije en el DEA, pero ahora con más motivo, espero que estéis tan orgullosos de mí como yo de formar parte de vosotros. A **Flor** y a **Pedro**, también os agradezco toda la ayuda que me habéis prestado estos últimos meses.

Para conseguir terminar un trabajo como este, que conlleva tanta constancia y esfuerzo ha sido importantísimo mi compañero, mi amigo, **Pedro**. Tengo tanto que agradecerle... Tu ayuda, tu apoyo constante, tus ánimos, tus mimos, tus críticas constructivas, tu paciencia infinita y tu sentido del humor que ha sido tan necesario en algunos momentos (no creo que haya mucha gente de tu gremio que sepa qué es Núcleo Accumbens). A lo largo de esta tesis hemos compartido y superado muchas cosas y espero que sigamos haciéndolo porque según dicen: *“Amar no es solamente querer, es sobre todo comprender”*. Gracias, sobre todo, por quererme tanto.

**El porvenir de un hombre no está en las estrellas, sino en la
voluntad y en el dominio de sí mismo**

A las personas que más quiero:

A mis padres

A mi hermano Nacho

A Pedro

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Bases neurobiológicas de la adicción a drogas de abuso.....	3
1.1. Circuitos cerebrales implicados en la adicción. Papel del núcleo accumbens y de la corteza prefrontal.....	4
2. Adicción a cocaína.....	9
2.1. Propiedades farmacológicas de la cocaína.....	9
2.2. Efecto de la cocaína sobre el circuito cerebral de recompensa.....	11
3. Adicción a morfina.....	13
3.1. Propiedades farmacológicas de la morfina.....	13
3.2. Efecto de la morfina sobre el circuito cerebral de recompensa.....	14
4. Vulnerabilidad individual a los efectos adictivos de las drogas de abuso.....	15
4.1. Condonamiento preferencial al sitio (CPP). Aplicación al estudio de la vulnerabilidad diferencial a la adicción a drogas de abuso.....	18
4.2. Estudio de la vulnerabilidad a sustancias adictivas en ratas de las razas Fischer (F344) y Lewis.....	20
5. Proteómica y drogas de abuso.....	22
5.1. Definición de Proteómica.....	22
5.2. Técnicas empleadas en Proteómica.....	23
5.2.1. Electroforesis bidimensional.....	25
5.2.2. Espectrometría de masas.....	26
5.2.3. Otras técnicas empleadas en Proteómica.....	28
5.3. Aplicación de las técnicas de Proteómica al estudio de la adicción a drogas de abuso.....	30

II. OBJETIVOS.....	37
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
1. Animales.....	43
2. Extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por drogas.....	43
2.1. Extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína.....	44
2.1.1. Precondicionamiento.....	44
2.1.2. Condicionamiento.....	45
2.1.3. Libre elección.....	45
2.1.4. Fase de extinción.....	45
2.2. Extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina.....	46
2.2.1. Fase de extinción.	47
3. Estudio comparativo entre ratas F344 y Lewis.....	48
4. Análisis proteómico del núcleo accumbens y corteza prefrontal de la rata.....	49
4.1. Extracción y purificación de las proteínas de la muestra.....	50
4.2. Isoelectroenfoque (IEF): 1ª Dimensión.....	51
4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE): 2ª Dimensión.....	51
4.4. Tinción de los geles.....	52
4.4.1. Tinción con plata.....	52
4.4.2. Tinción con azul de Coomassie coloidal.....	53
4.5. Análisis de imagen.....	53
4.6. Espectrometría de masas.....	53
5. Análisis de la fosforilación de proteínas en el núcleo accumbens de animales con diferente vulnerabilidad a la adicción a morfina y cocaína.....	55
5.1. Extracción y purificación de las proteínas de la muestra.....	56

5.2. Isoelectroenfoco (IEF): 1ª Dimensión.....	56
5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE): 2ª Dimensión.....	57
5.4. Tinción de los geles para visualizar las proteínas fosforiladas.....	57
5.5. Análisis de imagen.....	58
5.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	58
6. Confirmación mediante Western Blot de los datos obtenidos en los estudios de electroforesis bidimensional.....	60
7. Análisis estadístico.....	62
7.1. Análisis de los datos de los ensayos de condicionamiento preferencial al sitio.....	62
7.2. Análisis de los datos de Proteómica.....	62
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
1. Estudio de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por drogas.....	67
1.1. Establecimiento del protocolo de extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína.....	67
1.2. Establecimiento del protocolo de extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por morfina.....	70
2. Extinción de la preferencia al sitio inducida por drogas.....	72
2.1. Extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	72
2.2. Extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	74
3. Análisis proteómico.....	78
3.1. Análisis proteómico de núcleos cerebrales de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	78
3.1.1. Análisis proteómico del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	78

3.1.1.1. Análisis de la fosforilación de proteínas en el NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	92
3.1.2. Análisis proteómico de la CPF de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	100
3.1.3. Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas detectadas en el NAcc y la CPF de los animales procedentes del CPP de cocaína.....	111
3.2. Análisis proteómico de núcleos cerebrales de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	118
3.2.1. Análisis proteómico del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	118
3.2.1.1. Análisis de la fosforilación de proteínas en el NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	137
3.2.2. Análisis proteómico de la CPF de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	143
3.2.3. Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas detectadas en el NAcc y la CPF de los animales procedentes del CPP de morfina.....	155
3.3. Análisis proteómico de núcleos cerebrales de ratas F344 y Lewis.....	160
3.3.1. Análisis proteómico del NAcc de ratas F344 y Lewis.....	161
3.3.2. Análisis proteómico de la CPF de ratas F344 y Lewis.....	180
3.3.3. Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas detectadas en el NAcc y la CPF de ratas F344 y Lewis.....	195
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	205
VI. CONCLUSIONES.....	213
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	219

INDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1: Circuitos neuronales claves en la adicción. Representación en un diagrama sagital medio del cerebro de rata.....	6
Figura 2: Estructura química de la molécula de cocaína.....	9
Figura 3: Arbusto de <i>Erithroxylum coca</i>	9
Figura 4: Mecanismo de acción de la cocaína.....	10
Figura 5: Estructura química de la molécula de morfina.....	13
Figura 6: Flor de <i>Papaver somniferum</i>	13
Figura 7: Acción farmacológica de la morfina sobre los terminales sinápticos.....	14
Figura 8: Pasos básicos en un estudio de Proteómica clásico.....	24

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 9: Laberinto empleado en los ensayos de comportamiento.....	44
Figura 10: Fases del estudio de la extinción de la preferencia espacial inducida por cocaína.....	44
Figura 11: Fases del estudio de la extinción de la preferencia espacial inducida por morfina.....	47
Figura 12: Fases del ensayo del estudio comparativo de los efectos de morfina o cocaína en ratas Lewis y F344.....	48

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 13: Porcentaje de estancia en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína.....	68
Figura 14: Porcentaje de estancia en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por morfina.....	71
Figura 15: Test de condicionamiento al sitio inducido por cocaína.....	72
Figura 16: Extinción del comportamiento al sitio inducido por cocaína.....	74

Figura 17: Test de condicionamiento al sitio inducido por morfina.....	75
Figura 18: Extinción del comportamiento al sitio inducido por morfina.....	76
Figura 19: Gel bidimensional representativo de las proteínas de NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína.....	82
Figura 20: Expresión de las proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína identificadas por espectrometría de masas.....	84
Figura 21: Gel bidimensional representativo de las proteínas fosforiladas del grupo E SAL de NAcc.	94
Figura 22: Expresión de las proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína identificadas por espectrometría de masas.....	96
Figura 23: Gel bidimensional representativo de las proteínas de CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína.....	103
Figura 24: Expresión de las proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína identificadas por espectrometría de masas.....	105
Figura 25: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de cocaína.....	113
Figura 26: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación NE SAL vs E SAL del CPP de cocaína.	115
Figura 27: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación NE COC vs E COC del CPP de cocaína.....	117
Figura 28: Gel bidimensional representativo de las proteínas de NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina.....	124
Figura 29: Expresión de las proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por morfina identificadas por espectrometría de masas.....	126
Figura 30: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de PRDX-2 en el NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	132
Figura 31: Gel bidimensional representativo de las proteínas fosforiladas del NAcc de los animales obtenidos en el ensayo de la extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	139

Figura 32: Expresión de las proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por morfina identificadas por espectrometría de masas.....	141
Figura 33: Gel bidimensional representativo de las proteínas de CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina.....	146
Figura 34: Expresión de las proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por morfina identificadas por espectrometría de masas.....	148
Figura 35: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de morfina.	157
Figura 36: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación NE SAL vs E SAL del CPP de morfina.....	159
Figura 37: Gel bidimensional representativo de las proteínas del NAcc de animales F344 y Lewis.....	168
Figura 38: Expresión de las proteínas del NAcc de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas.....	170
Figura 39: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de DRP-2 en el NAcc de ratas F344 y Lewis.....	174
Figura 40: Gel bidimensional representativo de las proteínas de la CPF de animales F344 y Lewis.....	185
Figura 41: Expresión de las proteínas de la CPF de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas.....	187
Figura 42: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en ratas F344 y Lewis.	197
Figura 43: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación L SAL vs F SAL.....	199
Figura 44: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación L COC vs F COC.....	201
Figura 45: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación L MOR vs F MOR.....	203

INDICE DE TABLAS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1: Grupos de animales obtenidos en el ensayo de extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína.....46

Tabla 2: Grupos de animales obtenidos en el ensayo de extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina.....48

Tabla 3: Grupos experimentales del estudio comparativo entre ratas Lewis y F344.....49

Tabla 4: Grupos de animales utilizados para el análisis de fosforilación de proteínas en el NAcc.....56

Tabla 5: Anticuerpos y diluciones utilizadas en los ensayos de Western Blot.....61

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6: Tiempo de estancia de los animales en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína.....69

Tabla 7: Tiempo de estancia de los animales en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por morfina.....70

Tabla 8: Tiempo de estancia de los animales en el brazo asociado a la cocaína en la extinción del condicionamiento al sitio.....73

Tabla 9: Tiempo de estancia de los animales en el brazo asociado a la morfina en la extinción del condicionamiento al sitio.....76

Tabla 10: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles del NAcc de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....79

Tabla 11: Proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales.....80

Tabla 12: Proteínas identificadas por espectrometría de masas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína.....83

Tabla 13: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....86

Tabla 14: Puntos cuyo volumen varió significativamente en el estudio de fosforilación de proteínas realizado con el NAcc de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	92
Tabla 15: Proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína identificadas por espectrometría de masas.....	95
Tabla 16: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles de la CPF de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	100
Tabla 17: Proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales.....	101
Tabla 18: Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	104
Tabla 19: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.....	107
Tabla 20: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de cocaína.....	112
Tabla 21: Puntos detectados en los geles bidimensionales obtenidos de los NAcc procedentes de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	119
Tabla 22: Proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales.....	120
Tabla 23: Proteínas identificadas por espectrometría de masas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	125
Tabla 24: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.	129
Tabla 25: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de PRDX-2 en el NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	130
Tabla 26: Puntos cuyo volumen varió significativamente en el estudio de fosforilación de proteínas realizado con el NAcc de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	138
Tabla 27: Proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina identificadas por espectrometría de masas.....	140

Tabla 28: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles de la CPF de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	143
Tabla 29: Proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales.	144
Tabla 30: Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la corteza prefrontal de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.....	147
Tabla 31: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.	150
Tabla 32: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de morfina.....	156
Tabla 33: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles del NAcc de animales F344 y Lewis.....	161
Tabla 34: Proteínas del NAcc de animales F344 y Lewis cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales.....	162
Tabla 35: Proteínas del NAcc de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas.....	169
Tabla 36: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas del NAcc de las ratas F344 y Lewis.....	172
Tabla 37: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de DRP-2 en el NAcc de ratas F344 y Lewis.....	173
Tabla 38: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles de la corteza prefrontal de animales F344 y Lewis.....	180
Tabla 39: Proteínas de la CPF de animales F344 y Lewis cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales.....	181
Tabla 40: Proteínas de CPF de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas.....	186
Tabla 41: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas de la corteza prefrontal de las ratas F344 y Lewis.....	189
Tabla 42: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en ratas F344 y Lewis.....	196

ABREVIATURAS MÁS EMPLEADAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-hidroxi-5-metil-4isoxazolpropionato

ARN: Ácido Ribonucleico

ATP5a1: ATPasa subunidad α

ATV: Área Tegmental Ventral

CPF: Corteza Prefrontal

CPP: Condicionamiento Preferencial al sitio (del inglés, conditioned place preference)

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (del inglés, cAMP response element-binding).

D.O.: Densidad Óptica

DIGE: Del inglés, Differential Gel Electrophoresis

DRP: Proteína relacionada con la dihidropirimidasa (del inglés, Dihidropirimidase related proteína)

E COC: Animales Sprague-Dawley que extinguieron la conducta adictiva y se les administró cocaína tras el test de extinción.

E MOR: Animales Sprague-Dawley que extinguieron la conducta adictiva y se les administró morfina tras el test de extinción.

E SAL: Animales Sprague-Dawley que extinguieron la conducta adictiva y se les administró suero fisiológico tras el test de extinción.

E.S.M.: Error Standar Medio

ESI: Ionización mediante electrospray (del inglés,

F COC: Animales Fischer 344 tratados con cocaína

F MOR: Animales Fischer 344 tratados con morfina

F SAL: Animales Fischer 344 tratados con suero fisiológico

F344: Fischer 344

i.p.: Vía intraperitoneal

ICAT: Del inglés, Isotope-Coded Affinity Tags

IEF: Isoelectroenfoque

iTRAQ: Del inglés, isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification

L COC: Animales Lewis tratados con cocaína

L MOR: Animales Lewis tratados con morfina

L SAL: Animales Lewis tratados con suero fisiológico

MALDI: Ionización desorción con láser asistida con matriz (del inglés, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MS: Espectrometría de Masas (del inglés, Mass Spectrometry)

n.d.: Proteína no detectada

NAcc: Núcleo Accumbens

NE COC: Animales Sprague-Dawley que extinguieron la conducta adictiva y se les administró cocaína tras el test de extinción.

NE MOR: Animales Sprague-Dawley que extinguieron la conducta adictiva y se les administró morfina tras el test de extinción.

NE SAL: Animales Sprague-Dawley que no extinguieron la conducta adictiva y se les administró suero fisiológico tras el test de extinción.

NMDA: N-metil-D-aspartato

P.M.: Peso Molecular

PAGE: Del inglés, Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PFAG: Proteína Fibrilar Ácida de la Glia

pI: Punto Isoeléctrico

PRDX: Peroxirredoxina

SDS: Dodecilsulfato Sódico

SILAC: Del inglés, Stable Isotope-Labeling with Amino acids in Cell culture

SNC: Sistema Nervioso Central

TOF: Del inglés, Time Of Flight

UCLH1: Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa, isoforma 1

I. INTRODUCCIÓN

1. Bases neurobiológicas de la adicción a drogas de abuso.

La drogodependencia está considerada como una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por un deseo irresistible (*craving*) de repetir la administración de una droga, con el fin de obtener efectos placenteros o de evitar el malestar que produce su ausencia (Martín y Lorenzo, 2003). Este trastorno de la conducta obedece a una serie de mecanismos biológicos, los cuales pueden dar lugar a alteraciones fisiológicas y psicológicas responsables de distintos efectos entre los que cabe destacar la recaída en el consumo de drogas, ya que supone una de las características principales de esta enfermedad.

En la mayoría de los países, la adicción a las drogas constituye un serio problema de salud pública. Además de causar una alta mortalidad, la drogodependencia se asocia a un incremento de la criminalidad, de los problemas laborales y de la ruptura de vida familiar lo que conlleva una fuerte presión emocional y económica sobre el individuo, su entorno y la sociedad en general. Los efectos de las drogas dependen en primer lugar de las características farmacotxicológicas intrínsecas de cada sustancia en particular, aunque varían en gran medida dependiendo del ambiente que rodea al consumo, y del perfil biopsicosocial de cada individuo. Por lo que, tanto factores genéticos y epigénéticos como factores ambientales, tienen un papel muy importante en los procesos de drogadicción. De hecho existen autores que afirman que la adicción a drogas es el resultado de la interacción entre los factores genéticos y ambientales (Ellenbroek y col., 2005).

El consumo continuo y prolongado de sustancias adictivas puede provocar adaptaciones biológicas en el individuo que se manifiestan por la aparición de fenómenos como la tolerancia y la dependencia física (Chefer y Shippenberg, 2009). Cuando esto ocurre, el consumidor tiende a incrementar sus dosis para reproducir los efectos deseados (desarrollo de tolerancia) y a mantener un consumo continuo para evitar la aparición de un síndrome de abstinencia (desarrollo de dependencia física). Se habla también de dependencia psicológica para explicar por qué los individuos que no tienen dependencia física o que la han superado exhiben, a pesar de ello, una acusada inclinación al consumo. De forma global se entiende por síndrome de dependencia el conjunto de factores que contribuyen a que un individuo centre su conducta en la búsqueda y el consumo de drogas (Colado y Alguacil, 2008). Otro fenómeno asociado al consumo crónico de sustancias adictivas es la sensibilización de los sistemas biológicos

sobre los que actúa, de manera que éstos responden cada vez con mayor intensidad tanto a la propia droga como a otros estímulos (Robinson y Berridge, 2008). Este tipo de sensibilización puede permanecer mucho tiempo después de haber abandonado el hábito de drogadicción, de tal forma que la reinstauración de la conducta adictiva se puede volver a producir tras el consumo de la droga aunque sea en dosis muy bajas. El estrés y la exposición a los ambientes asociados al consumo de la droga, también pueden contribuir a reinstaurar la conducta adictiva (Feltenstein y See, 2008)

Todas las sustancias psicoactivas que son capaces de generar dependencia, deben poseer la propiedad de actuar como reforzador positivo, entendiéndose como tal el estímulo que incrementa la frecuencia de la conducta que conduce a su presentación (Ambrosio y col., 1995). De hecho, las drogas de abuso actúan de igual manera sobre algunos circuitos cerebrales que los reforzadores naturales como son la comida, la bebida, el sexo o las relaciones sociales (Kelley y Berridge, 2002) e incluso llegan a sustituirlos.

Por el momento, no se conocen suficientemente los fenómenos moleculares que provocan la tendencia a las recaídas en los consumidores de drogas de abuso que previamente habían abandonado el hábito de consumo. Los avances conseguidos en la neurobiología de la adicción apenas se han traducido aún en tratamientos farmacológicos novedosos que eviten de forma potente y específica el deseo de consumo y las recaídas, por lo que el mantenimiento de la abstinencia sigue constituyendo uno de los principales problemas en el ámbito de la farmacoterapia de los trastornos adictivos (Colado y Alguacil, 2008).

1.1. Circuitos cerebrales implicados en la adicción. Papel del núcleo accumbens y de la corteza prefrontal.

Las drogas de abuso activan distintos núcleos cerebrales de la vía mesocorticolímbica dopaminérgica, también denominado circuito cerebral de recompensa (Nestler, 2004; Figura 1), y que, como se ha comentado anteriormente, también participa en la acción de reforzadores naturales como la comida, la bebida, el sexo o las relaciones sociales (Kelley y Berridge, 2002). La base de dicho circuito incluye los cuerpos de las neuronas dopaminérgicas que se originan en el área tegmental ventral (ATV) e inervan estructuras del sistema límbico, entre las que destaca el núcleo accumbens (NAcc), y otras estructuras corticales, como la corteza prefrontal (CPF) (Nestler, 2001a; Di Chiara y col., 2004) (Figura 1). Algunos estudios muestran que

lesiones sobre NAcc y ATV, disminuye de forma severa la autoadministración de cocaína y heroína (Roberts y col. 1980; Roberts y Koob, 1982), demostrando de esta forma, la implicación de estos núcleos cerebrales en la adicción a las drogas de abuso. En el NAcc convergen todas las sustancias adictivas para producir sus efectos agudos de recompensa mediante el aumento de la liberación de dopamina y, en el caso de algunas de estas sustancias, actuando en dicho núcleo mediante mecanismos independientes de la dopamina (Nestler, 2004).

Además, del NAcc, otras estructuras límbicas, como la amígdala, o el hipocampo juegan también un importante papel en los efectos de las drogas de abuso (Feltenstein y See, 2008) (Figura 1). La amígdala es una región implicada en el establecimiento de la asociación entre el efecto de la exposición a una droga y el ambiente en el que ésta es administrada, así como en los síntomas aversivos producidos por la abstinencia. El hipocampo constituye un área crucial en la memorización del contexto de exposición a la droga y en el periodo de abstinencia. El hipotálamo, por su parte, es una zona importante en la mediación de muchos de los efectos fisiológicos de las drogas. Por otro lado, estructuras corticales, como la CPF, la corteza orbitofrontal o la corteza cingulada anterior, regulan las respuestas emocionales y la región correspondiente a la corteza frontal, ejerce el control que ejerce el individuo sobre el uso de la droga (Volkow y col., 1993; Chao y Nestler, 2004)

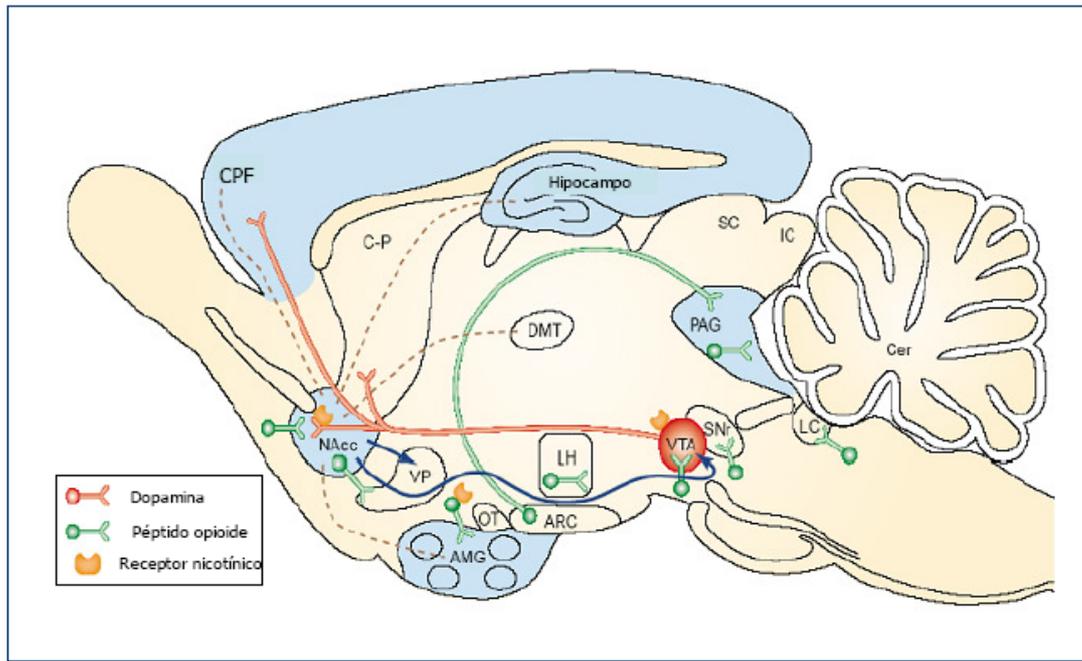


Figura 1. Circuitos neuronales claves en la adicción. Representación en un diagrama sagital medio del cerebro de rata. Las líneas discontinuas indican las aferencias límbicas hacia el NAcc. Las flechas azules representan las eferencias del NAcc que están implicadas en el efecto de recompensa de la droga. Las rutas dopaminérgicas señalan las proyecciones del sistema límbico dopaminérgico que pueden estar implicadas en la recompensa. Este sistema se origina en el área tegmental ventral (VTA) y se proyecta hacia el NAcc y otras estructuras límbicas, incluidos el tubérculo olfatorio (OT), los dominios ventrales del caudado putamen (C-P), la amígdala (AMG) y el córtex prefrontal (CPF). Las rutas del péptido opioide representan las neuronas que contienen dicho péptido, y están implicadas en el efecto de recompensa de los opiáceos, el etanol y la nicotina. Los sistemas del péptido opioide incluyen los circuitos encefalinérgicos (segmentos cortos) y el circuito hipotálmico de la beta endorfina (segmento largo). Las áreas en azul indican la distribución hipotética de los complejos de receptores GABA_A, que podrían contribuir a los efectos de recompensa producidos por el etanol. ARC, núcleo arcuato; Cer, cerebelo; DMT, tálamo dorsomedial; IC, colliculus inferior; LC, locus coeruleus; LH, hipotálamo lateral; PAG, área periacueductal; SC, colliculus superior; SNr, substantia nigra pars reticulata; VP, pallidum ventral (adaptado de Nestler, 2004).

Además del sistema dopaminérgico, existen otros sistemas de neurotransmisores implicados en mayor o menor medida en los procesos de adicción; así la neurotransmisión glutamatérgica participa también en las respuestas celulares y conductuales tempranas producidas por las drogas de abuso (Mohn y col., 2004) y el sistema serotoninérgico contribuye en el efecto producido por los psicoestimulantes como la cocaína (Hamon, 2002). Adicionalmente, otras drogas de abuso como los opioides, el alcohol o la nicotina abarcan a otros sistemas de neurotransmisores como el de los opioides endógenos, el sistema GABAérgico y el sistema colinérgico, respectivamente (Laakso y col., 2002). Estudios recientes corroboran que la noradrenalina influye en los circuitos cerebrales que controlan múltiples aspectos de adicción, incluida la sensibilización, la recompensa y la recaída (Weinshenker y

Schroeder, 2007). Todas las drogas de abuso producen además, alteraciones en la regulación de los sistemas cerebrales de estrés, como por ejemplo, alteraciones en la actividad de la hormona adrenocorticotropa, la corticosterona, el factor liberador de corticotropina y la dinorfina (Koob y Le Moal, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, todas las drogas de abuso mediante distintos mecanismos, producen un aumento en la liberación de dopamina en el NAcc, por ello multitud de estudios se centran en este núcleo como una de las regiones principales de la vía mesolímbica dopaminérgica implicada en procesos de drogadicción. El NAcc está compuesto por dos subregiones, *core* y *shell*, las cuales se distinguen por la diferente expresión de neuropéptidos, la morfología, las propiedades de la membrana y las conexiones sinápticas con distintas estructuras aferentes (Meredith, 1999). El *core* parece jugar un papel importante en el comportamiento guiado hacia una meta específica cuando está basado en el aprendizaje, mientras que el *shell* parece ser crucial en los comportamientos de búsqueda de recompensa incondicionados (Cassaday y col., 2005; Jongen-Rêlo y col., 2003). Las diferencias a nivel funcional parecen estar asociadas con la distinta regulación de la liberación de dopamina en estas subregiones. De tal modo, diversos estudios han mostrado diferentes patrones de liberación de dopamina en *core* y *shell* del NAcc durante ensayos de comportamiento de búsqueda de recompensa (Bassareo y Di Chiara, 1999; Sokolowski y col., 1998). Sin embargo, a pesar de las claras diferencias existentes entre *core* y *shell*, otros estudios revelan que las neuronas localizadas tanto en una subregión del NAcc como en la otra, poseen interacciones a través de los axones colaterales que se extienden entre ambas partes (Van Dongen y col., 2005), lo que indicaría que *core* y *shell* no se comportarían como entidades independientes a la hora de procesar información en el NAcc.

Una vez instaurada la adicción, el NAcc también está implicado en su mantenimiento, extinción y reinstauración. En lo que respecta a la extinción, se ha demostrado que a medida que se desarrolla, se incrementa la expresión de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA en el *shell* del NAcc, de forma que la expresión de dicha subunidad se correlaciona positivamente con el grado de extinción y negativamente con las recaídas en la conducta de búsqueda de cocaína (Sutton y col., 2003). En este sentido, la administración en el NAcc de antagonistas de los receptores AMPA, kainato o NMDA inhibe la conducta de búsqueda de cocaína tras la exposición a señales previamente asociadas a la administración de la droga (Di Ciano y Everitt, 2001; Backstrom y Hyttia, 2007). En lo que respecta a la adicción a opiodes, se ha descrito que la exposición a estímulos previamente asociados a morfina, aumenta la liberación de dopamina en el

shell del NAcc (Bassareo y col. 2007) y que el bloqueo de los receptores D1 o el aumento de los niveles de acetilcolina del NAcc inhibe la reinstauración de la conducta de búsqueda de heroína (Bossert y col., 2007; Zhou y col., 2007).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que las conexiones glutamatérgicas y dopaminérgicas del NAcc con la CPF juegan un importante papel en el control de la conducta de búsqueda de la droga (Peters y col., 2009). Por ejemplo, la exposición a estímulos asociados a heroína o a cocaína produce un aumento de la conducta de búsqueda de la droga que se corresponde con un aumento de la expresión de cFos en la CPF, y que es revertido con la administración de antagonistas de los receptores D1 (Koya y col., 2006; Ciccocioppo y col., 2001). Más aún, la inactivación de la CPF con tetrodotoxina (McLaughlin y See, 2003), lidocaína (Di Pietro y col., 2006) o con agonistas gabaérgicos (Rogers y col., 2008) inhibe la reinstauración de la conducta de búsqueda de heroína o cocaína tras la exposición a señales previamente asociadas a la droga. De forma que se ha postulado que la exposición repetida a las drogas produce adaptaciones celulares en las conexiones NAcc-CPF que contribuyen a la persistencia del comportamiento adictivo, disminuyendo el control cognitivo y aumentando la respuesta a los estímulos asociados a la droga (Kalivas y Volkow, 2005). Además, se ha sugerido que la extinción de la conducta de búsqueda de la droga depende de la conexión glutamatérgica entre el *shell* del NAcc y la CPF (Peters y col., 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, los estudios realizados en esta Tesis se han centrado en los efectos de drogas de abuso de referencia, como la morfina o la cocaína, en el NAcc y en la CPF.

En cuanto a la elección de cocaína y morfina como drogas de referencia, es bien conocido que la cocaína, es una de las drogas de abuso con mayor potencial adictivo, encontrándose entre las más consumidas en nuestro medio (Kreek y col., 2005), por lo que los fenómenos biológicos asociados a su consumo constituyen en principio una referencia obligada para su estudio. Por otro lado, la morfina es el agonista opioide prototípico cuyo potencial de abuso es bien conocido; además presenta el interés adicional de que los mecanismos opioides están involucrados, al menos parcialmente, en el potencial de abuso de otras drogas como la nicotina, el etanol y los cannabinoides (Contet y col., 2004). Hay que señalar, que si bien es cierto, que en la actualidad la morfina no es el opiáceo más utilizado como droga de abuso, el hecho de haber sido escogida para la realización de este trabajo, obedece en parte a la potencial trascendencia de los resultados en el terreno de la farmacología del dolor, campo que constituye otra línea de investigación de máximo interés para nuestro grupo de investigación. De hecho, en nuestro laboratorio se han estudiado de forma paralela las

diferencias en la actividad del sistema opioide endógeno y en la respuesta analgésica a la morfina entre ratas con distinta vulnerabilidad ante el dolor (Herradon y col., 2003a, 2003b y 2008). Además y siguiendo en esta línea, el conocimiento integral de los perfiles de expresión proteica asociados a los diferentes efectos de la morfina, puede contribuir a profundizar en el conocimiento de fenómenos de gran trascendencia y actualidad como es el caso del riesgo de adicción en distintas subpoblaciones de pacientes con dolor crónico tratados con analgésicos opioides (Højsted y Sjøgren, 2008).

2. Adicción a cocaína.

Actualmente, el abuso de sustancias adictivas es uno de los principales problemas de la sociedad. De hecho, según la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2007-2008, España fue el país mundial con mayor porcentaje (3%) de población consumidora de cocaína en polvo durante 2005. Según los datos obtenidos en la última encuesta de este tipo (2009-2010) este porcentaje habría bajado en casi medio punto porcentual (2,6%) en el mismo sector de la sociedad, siendo la primera bajada de consumo de este tipo de droga en 15 años. Aunque estos datos mejoran notablemente la situación, el porcentaje de consumición sigue siendo muy elevado por lo que supone un problema tanto sanitario como económico sumamente importante a la sociedad.

2.1. Propiedades farmacológicas de la cocaína.

La cocaína es un éster alcaloide, el estrilbenzoil de metilecgonina (figura 2), que se obtiene de las hojas de las especies *Erythroxylum coca lam* y *Erythroxylum novogranatense*, plantas originarias de los Andes.

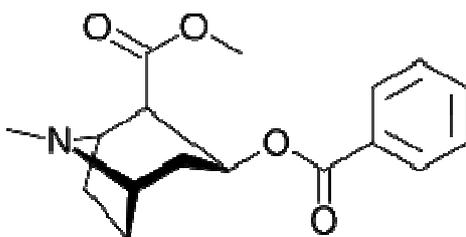


Figura 2: Estructura química de la molécula de cocaína



Figura 3: Arbusto de *Erythroxylum coca*

La masticación de las hojas por parte de las comunidades indígenas en algunas zonas de Sudamérica constituye la forma más antigua de uso y abuso de la cocaína. No obstante, la mayor parte se deriva a la producción de la pasta base de coca mediante la precipitación de los alcaloides básicos, producto intermedio en la fabricación del clorhidrato de cocaína, la cual mediante distintos tratamientos dará lugar a las formas más habituales de consumo: clorhidrato de cocaína y cocaína base (Prinzleve y col., 2004).

El consumo continuado de cocaína produce tolerancia y dependencia por lo que el cese de la administración de esta droga produce en los individuos síndrome de abstinencia caracterizado principalmente por depresión, dificultad de concentración, irritabilidad, ansiedad, deseo irresistible de consumo (*craving*), hipersomnia, astenia, disforia, trastornos de la coordinación, taquicardia, vértigos y diarrea (Lizasoain y Moro, 2003).

La cocaína bloquea los canales de Na^+ dependientes de voltaje, derivándose de esta propiedad sus efectos como anestésico local. (Josephson y Sperelakis, 1976; Crumb y Clarkson, 1990). En los terminales monoaminérgicos produce la inhibición de la recaptación de dopamina, serotonina y noradrenalina a través del bloqueo competitivo de sus transportadores (Amara y Kuhar, 1993).

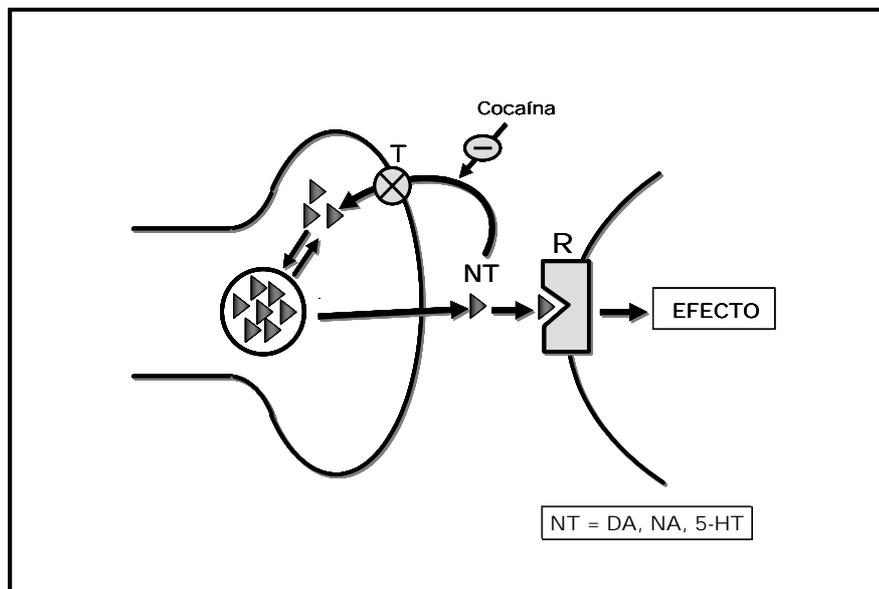


Figura 4: Mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína inhibe la recaptación de varios neurotransmisores (NT): dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) actuando sobre el transportador (T) que los recupera desde la hendidura sináptica; lo cual produce un aumento de los niveles sinápticos de dichos neurotransmisores y, por tanto, una mayor activación de sus receptores (R) postsinápticos.

De esta manera, se incrementa la cantidad de neurotransmisores en la sinapsis, lo cual estimula los receptores postsinápticos. Sus efectos sobre los niveles de dopamina y serotonina son los causantes más directos de las propiedades euforizantes (Kornetsky y Porrino, 1992; Uhl y col., 2002) y reforzadoras (Kreek y col., 2005)

En diversos estudios se ha observado que la cocaína además tiene afinidad por sitios de unión a receptores serotoninérgicos (Kilpatrick, 1996; Müller y col., 2007), muscarínicos M1 (Tanda y col., 2007) y M2 (Sharkey y col., 1988a) y receptores sigma (Sharkey y col., 1988b; Maurice y col., 2002), y es capaz de interactuar con distintos sistemas de neurotransmisores, principalmente el sistema opioide endógeno (Unterwald y col., 2001; Schroeder y col., 2003), el gabaérgico, el glutamatérgico (Steketee, 2005), y el endocannabinoide (Arnold, 2005; Caille y col., 2007).

2.2. Efecto de la cocaína sobre el circuito cerebral de recompensa.

Como ya se ha comentado en el punto 1.1., las propiedades reforzadoras de la cocaína y de las demás drogas de abuso, están claramente relacionadas con el sistema mesocorticolímbico. Diversos estudios han observado que lesiones en el NAcc y ATV atenúan la auto-administración de cocaína en ratas (Roberts y col., 1980; Roberts y Koob, 1982). Además, los niveles extracelulares de dopamina están aumentados en el NAcc de animales durante los ensayos de autoadministración (Weiss y col., 1992; Meil y col., 1995; Wise y col., 1995b); mientras que el tratamiento con inhibidores de la síntesis de dopamina (Wilson y Schuster, 1974) y con antagonistas dopaminérgicos, (Woolverton, 1986; Richardson y col., 1994) producen un claro descenso en la autoadministración de cocaína en animales de experimentación. Por otro lado, manipulaciones más específicas sobre el sistema mesocorticolímbico, como son lesiones en los cuerpos celulares del NAcc producidas con ácido kaínico, bloquean la autoadministración de cocaína (Zito y col., 1985). Además, el uso de cocaína de forma aguda o crónica, altera los niveles y/o la actividad de los transportadores de dopamina, así como los niveles de los receptores D1 y D2 (Schroeder y col., 2009). Las modificaciones inducidas por cocaína en la sensibilidad de los receptores de dopamina probablemente reflejan alteraciones en los mecanismos de transducción de señales. De tal modo, el tratamiento repetido con cocaína causa una regulación al alza de la vía de señalización del AMPc en el NAcc (Unterwald y col., 1993) y se reducen los niveles de las proteínas G inhibitorias en el ATV (Nestler y col., 1990)

Como se ha comentado en apartados anteriores, el uso continuado de las drogas de abuso produce cambios neuroquímicos en el circuito de recompensa. Así el ATV juega un importante papel para el desarrollo de la sensibilización conductual consistente en el progresivo aumento de la respuesta comportamental, tras exposiciones repetidas a cocaína (Kalivas y Steward, 1991). Esta sensibilización conductual, se acompaña de cambios adaptativos en la función del sistema dopaminérgico mesolímbico, así como de cambios en la respuesta de éste al glutamato. De modo, que el consumo de cocaína se asocia con el aumento de los niveles de glutamato en diversas regiones, como el estriado dorsal, el Nacc, el ATV, el septum, el pálido ventral o el cerebelo, y con un incremento en la respuesta de receptores AMPA localizados en neuronas dopaminérgicas del ATV. Además se ha observado un incremento en la expresión de GluR1 en el NAcc de ratas que exhiben un comportamiento sensibilizado en respuesta a cocaína (Boudreau y Wolf, 2005) sugiriendo una implicación de GluR1 en la neuroplasticidad inducida por cocaína (Wolf y col., 2004). Cabe señalar, además, que durante los periodos de abstinencia se ha observado una reducción del glutamato en el NAcc, lo cual parece ser clave en las conductas asociadas con las recaídas (Tzschentke y Schmidt, 2004; Uys y LaLumiere, 2008).

Tratamientos crónicos de cocaína producen alteraciones morfológicas, como son cambios en la densidad de las espinas dendríticas del NAcc (Kiraly y col., 2010), además de afectar a la expresión de un amplio número de genes en diferentes regiones cerebrales. Estos genes codifican para una gran variedad de funciones moleculares, desde factores de transcripción, receptores de neurotransmisores y transportadores, y mecanismos de transducción de señales. Algunos de estos cambios en la expresión génica son la base de los efectos comportamentales de la cocaína (Kelz y cols., 1999). Además, recientemente Freeman y colaboradores (2010) han encontrado variaciones en la expresión de numerosos genes en NAcc y CPF de animales a distintos tiempos del periodo de abstinencia en animales que previamente se habían autoadministrado cocaína.

3. Adicción a morfina

3.1. Propiedades farmacológicas de la morfina

La morfina es uno de los múltiples alcaloides presentes en el opio, jugo obtenido de la planta *Papaver somniferum* originaria de Europa. Ha sido empleada por el hombre con fines sociales y medicinales durante miles de años.

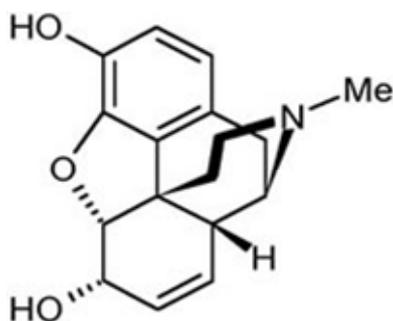


Figura 5: Estructura química de la molécula de morfina



Figura 6: Flor de *Papaver somniferum*

Aunque a la morfina se la considera el agonista opiáceo prototípico del receptor μ , se une también a los receptores δ y κ opiáceo. La administración de morfina produce analgesia, euforia, sedación, depresión respiratoria, supresión de la tos, náuseas, vómitos, miosis, disminución de la motilidad intestinal, estreñimiento, liberación de histamina, broncoconstricción e hipotensión, entre otros. El receptor μ lleva el peso sobre el control de estas funciones, de hecho, la mayoría de los fármacos opiáceos con interés clínico deben sus propiedades, principalmente a la estimulación de este receptor, el cual, se encuentra ampliamente distribuido en córtex, estriado, tálamo, hipocampo, locus coeruleus, ATV, NAcc y amígdala (Feltenstein y See, 2008; Somogyi y col., 2007).

Los receptores opiáceos son receptores acoplados a proteínas G_i - G_o , caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana con estructura de α -hélice. La unión del opioide al receptor provoca, mediante la subunidad α de la proteína G, una inhibición de la enzima adenilciclasa, responsable de la transformación de ATP en AMPc. Esta disminución produce a su vez un descenso de en la proteína quinasa A, encargada de la fosforilación de distintas proteínas entre las que se encuentran ciertos factores de transcripción como CREB (cyclicAMP-responsive element-binding protein) o c-Fos. Por

otra parte, las subunidades β y γ de la proteína G modulan los canales de calcio y potasio, y otros sistemas efectores, como puede ser la cascada ERK/MAPK (extracellular-regulated kinases / mitogen-activated protein kinase) (Martin y Goicochea, 2004; Connor y Christie, 1999).

La morfina puede administrarse por vía oral, intravenosa o intramuscular. Se metaboliza a morfina 6-glucurónido, compuesto con mayor actividad analgésica que la propia morfina. Además, su administración crónica produce tolerancia, dependencia y síndrome de abstinencia (Martín y Lorenzo, 2003) y es por ello que su consumo crónico como analgésico se encuentra limitado.

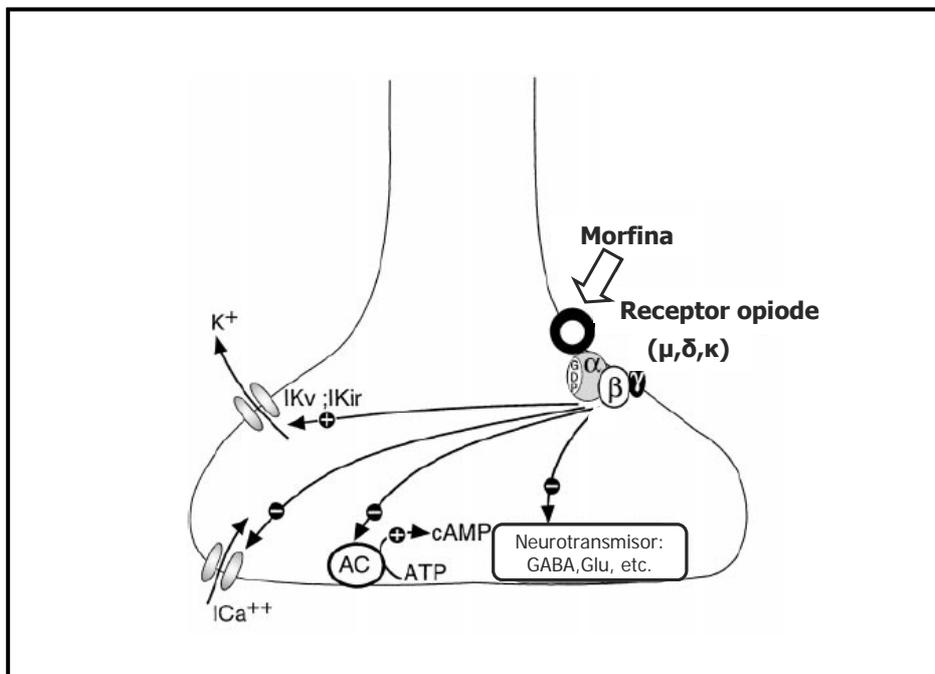


Figura 7: Acción farmacológica de la morfina sobre los terminales sinápticos. Los opiodes inhiben la liberación de neurotransmisores mediante distintos mecanismos, entre los que se incluyen la activación del intercambio de K^+ , la inhibición del intercambio de Ca^{2+} y la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) Adaptado de Williams y col., 2001.

3.2. Efecto de la morfina sobre el circuito cerebral de recompensa.

La morfina se une a los receptores opiodes μ del ATV provocando una inhibición de las neuronas gabaérgicas, lo que origina una activación de las neuronas dopaminérgicas y el consiguiente incremento de la transmisión dopaminérgica, principalmente en el *shell* del NAcc (Koob y Le Moal, 2001; Di Chiara y col., 2004). La activación crónica de este circuito y el consiguiente aumento permanente en los niveles de dopamina, constituye

uno de los mecanismos implicados en las propiedades reforzadoras de los opiodes y en el desarrollo de la adicción (Koob y col., 2004).

Por otro lado, diversos investigadores han postulado la existencia de otro mecanismo independiente de dopamina implicado en los efectos reforzadores de los opiodes. Así, estudios en roedores han demostrado que son capaces de autoadministrarse opiáceos incluso después de la destrucción de las proyecciones dopaminérgicas en el ATV (Koob y Le Moal, 2001). Del mismo modo ratas entrenadas a autoadministrarse heroína y que habían sufrido lesiones con 6-hidroxi-dopamina en el NAcc no mostraron cambios en la pauta de autoadministración ni modificaciones en la preferencia espacial inducida por morfina (Volkow y col., 2004).

Los opiodes además de activar NAcc y el ATV de la vía mesolímbica dopaminérgica, producen hiperreactividad dopaminérgica en la corteza prefrontal (Kalivas y col., 2005). Este área cerebral se encuentra implicado en procesos tales como el aprendizaje y la asociación entre estímulo y el refuerzo, siendo además el responsable del control e integración de la información de las distintas regiones cerebrales y de la ejecución de las acciones (Rodríguez de Fonseca, 2005). De esta manera, el incremento de los niveles de dopamina en esta región tras el tratamiento crónico de morfina podría explicar en parte el consumo compulsivo característico de la dependencia opiácea.

4. Vulnerabilidad individual a los efectos adictivos de las drogas de abuso.

El consumo de drogas, como conducta, es el resultado de la interacción de múltiples factores. No es posible responder de forma concisa y breve a la pregunta de porqué algunos individuos consumen droga y otros no, ni mucho menos pretender que esa respuesta sea válida para todos los casos. Pero ¿cómo se origina y se desarrolla este comportamiento?, ¿qué variables lo influyen?, ¿por qué unos individuos consumen y otros no?

Numerosos estudios de carácter epidemiológico sobre el consumo de drogas y sobre los factores asociados a este consumo, definen la naturaleza, el horizonte y la secuencia de la progresión desde el inicio del consumo hasta el abuso o adicción, y han identificado aquellos segmentos de la población que son más vulnerables al consumo y abuso de

sustancias, así como los factores asociados que contribuyen a esa vulnerabilidad. No obstante, no han podido ofrecer conclusiones que expliquen el porqué del consumo y abuso de unas personas y la abstinencia en otras. Clásicamente, estos trabajos, han clasificado, en “factores de riesgo y de protección” para el consumo de drogas, lo cual ha resultado de sumo interés de cara a planificar y desarrollar programas de prevención eficaces. Se entiende por factores de riesgo aquellas circunstancias o características personales y/o ambientales que combinadas entre sí, podrían resultar facilitadoras para el inicio o el mantenimiento del uso y abuso de drogas, mientras que los factores de protección se definen como aquellas variables que contribuyen a modular o limitar el uso de estas sustancias (Carballo y col, 2004). Evidentemente las conductas de uso y abuso de drogas no dependen de un factor aislado, sino que están originadas y mantenidas por diversos factores de naturaleza multidimensional.

La vulnerabilidad a sustancias adictivas está influenciada tanto por **factores ambientales** (Nader y Czoty., 2005; Jiménez-Muro Franco y col., 2009), entre los que cabe destacar las claves contextuales y el estrés, como por **factores genéticos y epigenéticos** (Nestler, 2001b; Tsankova y col., 2007; Drgon y col., 2010) que son los responsables de los cambios que se puedan producir en la traducción, expresión y función proteica (Kreek y col., 2005). Así, la susceptibilidad individual a la drogadicción parece radicar en la diferente sensibilidad del sistema nervioso central de los individuos ante los efectos reforzantes positivos (euforizantes) de las drogas. La adquisición de conductas adictivas parece estar basada en variaciones en la funcionalidad de algunos sistemas de neurotransmisores; así por ejemplo, el receptor de dopamina D2 está implicado en los efectos reforzadores de las drogas de abuso (Haile y Kosten, 2001). De tal modo, se sabe que en personas que tienen antecedentes de alcoholismo en la familia, lo cual supone un factor de riesgo para desarrollar esta patología, una mayor presencia de este subtipo de receptores en el cerebro puede ser un factor protector frente a la posibilidad de desarrollar dependencia a drogas de abuso (Volkow y col., 2006).

La variabilidad en la funcionalidad de los sistemas de neurotransmisores es probablemente congénita (influida bien directamente por genes específicos, bien indirectamente por factores epigenéticos durante el desarrollo perinatal). Además el consumo continuado de una droga produce neuroadaptaciones específicas que se asocian al funcionamiento anormal de la actividad dopaminérgica en el circuito mesocorticolímbico, produciendo como resultado una alteración en la neurotransmisión cortical y excitabilidad (Feil y Zangen, 2010). Las adaptaciones a largo plazo que se

producen en el hipocampo tras la exposición repetida a sustancias adictivas juegan un papel importante en la formación de la memoria. También se cree que la neuroplasticidad que está relacionada con el aprendizaje y la memoria pueda estar relacionada con los procesos de drogadicción (Billa y col., 2010). A través de la actuación de las drogas en estas regiones, es probable que se facilite la mayor vulnerabilidad que manifiestan algunos individuos hacia las sustancias adictivas. Además se sabe que, aún después de dejar de consumir, esas neuroadaptaciones se mantienen en el tiempo y contribuyen a las recaídas. Así, parece que estas neuroadaptaciones promueven aún más vulnerabilidad, dificultando la extinción de la dependencia y manteniendo el comportamiento (Ambrosio, 2003).

El riesgo biológico de desarrollar adicción a drogas de abuso es muy similar para individuos de la misma especie, por lo que los factores ambientales juegan un papel muy importante en el desarrollo de dicha adicción. Se ha observado tanto en animales de experimentación como en humanos que habían mostrado una conducta adictiva hacia ciertas drogas de abuso, que el consumo de dichas sustancias se veía reducido considerablemente cuando los individuos tenían la opción de elegir reforzadores naturales como la comida (Carroll y col., 1989; Nader y col., 1993). El estrés es otro factor ambiental que produce un aumento en la vulnerabilidad a la adicción y contribuye al riesgo de sufrir recaídas en el consumo de sustancias adictivas (Sinha, 2009). Por otro lado, se ha observado que ratas Wistar consumen mayor cantidad de solución acuosa de morfina cuando están sometidos a un aislamiento social mientras que su consumo de agua no se ve afectado (Raz y Berger, 2010). Además, en ratones C57BL/6J expuestos a estrés prenatal, se ha visto un incremento de la respuesta operante y del consumo de alcohol en su etapa adulta (Campbell, y col., 2009).

Por tanto, parece, que tanto factores genéticos y epigenéticos como factores ambientales, tienen un papel muy importante en los procesos de drogadicción. De hecho existen autores que afirman que la adicción a drogas es el resultado de la interacción entre los factores genéticos y ambientales (Ellenbroek y col., 2005; Uhart y Wand, 2009).

Existen varios modelos experimentales dirigidos al estudio de la vulnerabilidad individual a los efectos de las drogas. Este es el caso de los ensayos de autoadministración, el test de condicionamiento al sitio o los estudios en ratas Fischer 344 (F344) y Lewis. En este trabajo, se han utilizado dos de dichos modelos; el de extinción del condicionamiento preferencial y el modelo de ratas F344 y Lewis con el fin

de estudiar las posibles diferencias de expresión proteica marcadas por la susceptibilidad individual a los efectos de la cocaína y la morfina, así como con el propósito de poder establecer un paralelismo entre los dos modelos, los cuales se detallan en los apartados siguientes.

4.1. Condicionamiento preferencial al sitio (CPP). Aplicación al estudio de la vulnerabilidad diferencial a la dicción a drogas de abuso

El condicionamiento espacial es un test ampliamente utilizado para medir las propiedades adictivas de una sustancia. Es un modelo conductual en el que se valoran las propiedades motivacionales que adquieren aquellos estímulos ambientales que están asociados al consumo de una droga (Aguilar y col., 2009). Básicamente, se trata de cuantificar la preferencia o aversión de un animal por un determinado espacio después de una fase de condicionamiento en la que se asocian algunos estímulos ambientales con la administración del fármaco en estudio. Una vez realizado este condicionamiento, un incremento del tiempo de estancia en el espacio asociado a la droga en condiciones de libre elección se considera indicativo de las propiedades reforzadoras positivas de la misma; por el contrario el fármaco se considera aversivo si los animales tienden a evitar el espacio asociado con su administración (Carr y col., 1989).

El condicionamiento espacial se basa por tanto en el principio de que si un reforzador primario se asocia con estímulos ambientales inicialmente neutros, estos últimos adquieren propiedades reforzadoras secundarias (Tzschentke, 2007). Además, es un hecho que las drogas de abuso en humanos generan de forma consistente preferencia espacial en este modelo. Entre las ventajas que se han atribuido a este procedimiento con respecto a otros, hay que destacar su sencillez, su alta sensibilidad a los efectos de las drogas y el hecho de que evita las interferencias producidas por las acciones sensoriales y motoras de las drogas sobre la medida de refuerzo, ya que la prueba de libre elección se realiza en animales no expuestos a dicha droga (Swerdlow y col., 1989).

El modelo de condicionamiento espacial ha sido desde entonces profusamente utilizado para el estudio del potencial adictivo de drogas de abuso. Desgraciadamente, la falta de homogeneidad en la metodología utilizada por los distintos grupos ha complicado clásicamente el establecimiento de comparaciones y se ha sumado a las complicaciones conceptuales del modelo. Esta variabilidad está relacionada con el sexo, cepa y edad de los animales, la forma y número de compartimentos del aparato, los procedimientos

seguidos para el condicionamiento (dosis, vía de administración, número de administraciones, controles, tipos de estímulos ambientales), e incluso la cuantificación de la preferencia o aversión. No obstante, se han revisado datos experimentales que permiten evaluar la contribución de fenómenos como la novedad, la habituación, la actividad locomotora o los procesos de memoria/aprendizaje a las respuestas que se evalúan en el procedimiento (Swerdlow y col., 1989). Teniendo en cuenta por tanto, todas las limitaciones puestas de manifiesto en estos estudios, la utilización del modelo puede proporcionar, y de hecho lo hace, datos significativos para profundizar en el conocimiento de la neurobiología de la adicción a la morfina, cocaína y otras drogas de abuso; además esta técnica permite explorar la posibilidad de modular farmacológicamente las propiedades reforzadoras de las drogas (Tzschentke, 1998).

En los últimos años se han incorporado a los protocolos clásicos de condicionamiento, procesos característicos de la evolución de la drogadicción en humanos como son los periodos de no consumo o extinción de la conducta adictiva o las recaídas. Si bien hay que señalar, que es el investigador el que administra o interrumpe la dosificación de la droga a los animales y que además el consumo total de la sustancia adictiva tras el periodo de extinción es más bajo con respecto al uso compulsivo y crónico (Aguilar y col., 2009). Situación que no ocurre en los ensayos de autoadministración, donde se reproducen las condiciones de recaída en los procesos de adicción de forma similar a las situaciones ocurridas los humanos. Aún así, los protocolos de reinstauración de la conducta adictiva tras dichos periodos de extinción (Mueller y Stewart, 2000), demuestran la capacidad del ensayo para reproducir la compleja dinámica del proceso de la adicción, a caracterizar individuos con diferente sensibilidad a dicho proceso y en resumidas cuentas a aproximarnos a la claves biológicas que puedan estar determinando dicha problemática.

Por todo esto, y basándonos en la experiencia de nuestro grupo en la metodología del ensayo, hemos decidido utilizar el test del CPP para poner a punto, un modelo de extinción de la conducta de búsqueda de drogas que nos permita diferenciar individuos en función de su vulnerabilidad a la adicción a cocaína y morfina, atendiendo a la velocidad de extinción de dicha conducta; asumiendo que aquellos animales que extingan la preferencia con mayor dificultad son mas vulnerables a los efectos de las drogas.

4.2. Estudio de la vulnerabilidad a sustancias adictivas en ratas de las razas Fischer 344 y Lewis.

La búsqueda de marcadores biológicos en la vulnerabilidad al abuso de drogas sigue siendo una línea de investigación prioritaria en la actualidad. Las ratas de las razas F344 y Lewis, las cuales poseen carga genética muy similar aunque no idéntica, demuestran diferencias en la vulnerabilidad al consumo de sustancias adictivas (Haile y Kosten, 2001; Kosten y Ambrosio, 2002). Las ratas Lewis presentan una preferencia mucho mayor a un gran número de drogas de abuso cuando se comparan con las ratas F344 (Guitart y col., 1992). Si bien es cierto que las ratas F344 parecen adquirir conductas de búsqueda de drogas de manera más lenta que la raza Lewis, una vez desarrollada la conducta adictiva, esta última especie presenta una mayor velocidad de extinción (Stephens y Riley, 2009). Este hecho sugiere la idea de que mantener en el tiempo el consumo de la droga refleja mejor la vulnerabilidad a la adicción que la adquisición rápida de conductas de búsqueda de la droga, y según este hecho, las ratas F344 podrían ser consideradas más vulnerables a la adicción que las Lewis (Kosten y col., 2007).

Con el objetivo de intentar dilucidar estas diferencias en el comportamiento adictivo, distintos estudios han utilizado diferentes parámetros, como el control de la cantidad de droga administrada o la velocidad de repuesta en autoadministración, parámetros que están directamente relacionados con el grado de adicción de los individuos. Es por ello que habitualmente se usan como modelo para el estudio de la vulnerabilidad a la drogadicción (Christensen y col., 2009).

Autores como Kosten y colaboradores (1997), demostraron que las ratas F344 y Lewis difieren en su respuesta en los ensayos de autoadministración con cocaína. Las ratas Lewis muestran mayor repuesta hacia las sustancias psicoactivas, pero no presentan adaptaciones bioquímicas en el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico como consecuencia del consumo crónico de esta sustancia, mientras que las ratas F344 sí lo hacen. Los mismos autores demostraron que las ratas F344 se autoadministran mayor cantidad de cocaína que las ratas Lewis pero con un comportamiento operante menos efectivo (Kosten y col., 2007). Las ratas Lewis y F344 muestran diferencias en su sistema dopaminérgico mesolímbico, lo que podría estar directamente relacionado con las disparidad de sus comportamientos adictivos. Así, el incremento de los niveles de dopamina es generalmente mayor en el NAcc de ratas Lewis que en el de ratas F344 tras la administración de diferentes dosis de morfina, cocaína, anfetamina (Cadoni y Di Chiara, 2007) y nicotina (Candoni y col., 2009). En ensayos de autoadministración de

morfina con este tipo de animales, se han observado diferencias en la estructura de células piramidales de ciertas zonas de la corteza, lo que podría representar un sustrato anatómico para la distinta vulnerabilidad a los efectos reforzadores de la morfina en ratas F344 y Lewis (Ballesteros-Yañez y col., 2008). Por otro lado, se ha comprobado que existen diferencias significativas en la plasticidad hipocampal entre ratas F344 y Lewis (Prakash y col., 2009).

En 1995 Ortiz y colaboradores, describieron en ATV de ratas F344 una mayor expresión del factor de transcripción CREB que en ratas Lewis. En condiciones basales, se ha observado un descenso de la expresión del factor de transcripción Δ fosB en el NAcc de ratas F344 cuando se compararon con Lewis (Haile y col., 2001). Este factor de transcripción está muy ligado a los efectos crónicos de las drogas de abuso (Nestler, 2004). Todos estos resultados indican que la ruta AMPc-proteína quinasa A (PKA)-CREB, estaría regulada al alza en la raza Lewis en condiciones basales con respecto a la F344, lo cual podría estar relacionado con más cambios a otros niveles moleculares.

En lo que respecta a los receptores de dopamina, se ha observado que el receptor D2 presenta mayores niveles de expresión en el NAcc de ratas F344 frente a Lewis, mientras que el receptor D1 no presenta diferencias entre razas (Haile y Kosten, 2001). Otros autores han descrito cambios en ciertas proteínas y receptores relacionados con el sistema dopaminérgico. Así, el NAcc de las ratas Lewis muestra una disminución de la expresión de proteína tirosina hidroxilasa, dopamina y sus metabolitos, cuando se comparan con ratas F344. Además, en el estriado también presentan una disminución de transportadores de dopamina, así como de receptores D2 y D3. Por otro lado, Sánchez-Cardoso y colaboradores (2009), han demostrado que las ratas Lewis tienen aumentado los receptores D1 y D5 en hipocampo, tálamo y par reticulata de la sustancia negra.

En ratas F344 se han demostrado alteradas numerosas proteínas en el sistema mesolímbico cuando se someten a ensayos de administración de drogas de abuso, mientras que en ratas Lewis se han observado menos cambios. Así por ejemplo, Haile y col., 2001 encontraron una disminución en la expresión de tirosina hidroxilasa en el NAcc de ratas F344 tratadas crónicamente con cocaína. Por otro lado, los niveles de esta proteína y de la proteína fibrilar ácida de la glía (PFAG) estaban aumentados en el ATV, mientras que las ratas Lewis no presentaron variaciones significativas en los niveles de expresión. Por tanto, parece que las ratas F344 presentan una mayor neuroadaptación a nivel de diferentes proteínas y factores de transcripción en respuesta a tratamientos crónicos que las ratas Lewis.

Por lo que, a la vista de los trabajos expuestos anteriormente, parece evidente que las ratas F344 y Lewis son un buen modelo para el estudio de las diferencias en la vulnerabilidad al consumo de sustancias adictivas.

5. Proteómica y drogas de abuso.

5.1. Definición de Proteómica.

El término “proteoma” se usó por primera vez en 1995 (Wilkins y col., 1995), para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma y a la ciencia que lo estudia se le denominó Proteómica (Pandey y Mann, 2000). Un único genoma puede dar lugar a varios proteomas, ya que la expresión génica puede ser modulada en varios puntos de la transcripción (paso a ARN), del procesamiento (paso a ARN mensajero) y de la traducción (paso a proteínas) y aún después de ésta dando lugar a las llamadas modificaciones post-transduccionales. Y así, en contraste con el ADN o el ARN, las proteínas pueden ser modificadas mediante fosforilación, glicosilación, acetilación, sulfatación, etc; en total se han descrito hasta 300 modificaciones post-transduccionales (Aebersold y Goodlett, 2001). Todas esas modificaciones pueden afectar profundamente a la conformación, estabilidad, localización, interacciones y funciones de las proteínas (Morrison y col., 2002); de forma que es imposible predecir todas estas características a partir del estudio del genoma o del transcriptoma. El proteoma es, por tanto, un elemento altamente dinámico, cuyos componentes varían en un organismo, tejido, célula o compartimento subcelular dados, como consecuencia de cambios en su entorno o en su estado fisiológico o patológico. Por tanto, la acepción más precisa del término proteoma es la que se refiere al conjunto de proteínas que componen una célula o tipo celular dado, en unas condiciones determinadas. Y, en esta línea, se ha propuesto una definición más completa de Proteómica como la Ciencia que estudia la identidad, cantidad, estructura y función bioquímica y celular de todas las proteínas de un organismo, órgano u orgánulo y sus variaciones según el tiempo, el espacio y el estado fisiológico (Kenyon y col., 2002).

Teniendo en cuenta la definición anterior, podemos decir que la Proteómica puede empelarse para realizar tres tipos de estudios (Lubec y col., 2003):

- 1) Caracterización de las proteínas que se expresan en un compartimento biológico determinado (célula, tejido, órgano, etc). La identificación a gran escala de los componentes estos proteomas permite la catalogación de los mismos en bases de datos

que resultan de gran utilidad para los proyectos de investigación que necesiten un conocimiento detallado de esos proteomas.

2) Identificación de los componentes del proteoma que sufren alteraciones en sus niveles de expresión a consecuencia de alteraciones fisiopatológicas o inducidas por agentes externos; lo que se denomina “Proteómica de Expresión Diferencial”. Estos estudios tienen como finalidad la identificación de las proteínas que intervienen en dichos procesos, y que pueden actuar por tanto como marcadores biológicos o dianas farmacológicas.

3) Caracterización de las interacciones subcelulares existentes entre las proteínas y determinación de los componentes de complejos macromoleculares (“Proteómica de Mapa Celular”) (Grant y Blackstok, 2001). Estos proyectos pretenden investigar la función de las proteínas caracterizando las interacciones que sufren en el interior de la célula. Ya que, según un estudio realizado en la levadura *Sacharomices cerevisiae* (Schwikowski y col., 2000), las proteínas de función similar se encuentran formando complejos dentro de la célula. Así, es posible conocer la función de una proteína desconocida si se conoce la función de otras proteínas con las que se acompleja. Mediante este tipo de proyectos, aplicados de forma sistemática, los investigadores pretenden construir un mapa físico de las interacciones existentes entre las proteínas celulares.

5.2. Técnicas empleadas en Proteómica.

Los pasos clave en un estudio de Proteómica son la separación de las proteínas y el análisis e identificación de las proteínas separadas. Además, estos pasos clave se acompañan de otros destinados fundamentalmente a la preparación y purificación de la muestra (Alguacil y col., 2006; figura 8). En esta Tesis se ha utilizado el método más estandarizado, que consiste en combinar la electroforesis bidimensional con la espectrometría de masas para separar e identificar, respectivamente, las proteínas (Chevalier, 2010); por lo que estas técnicas se describirán con detalle a continuación. Otras técnicas empleadas en Proteómica se describen de forma sucinta más adelante.

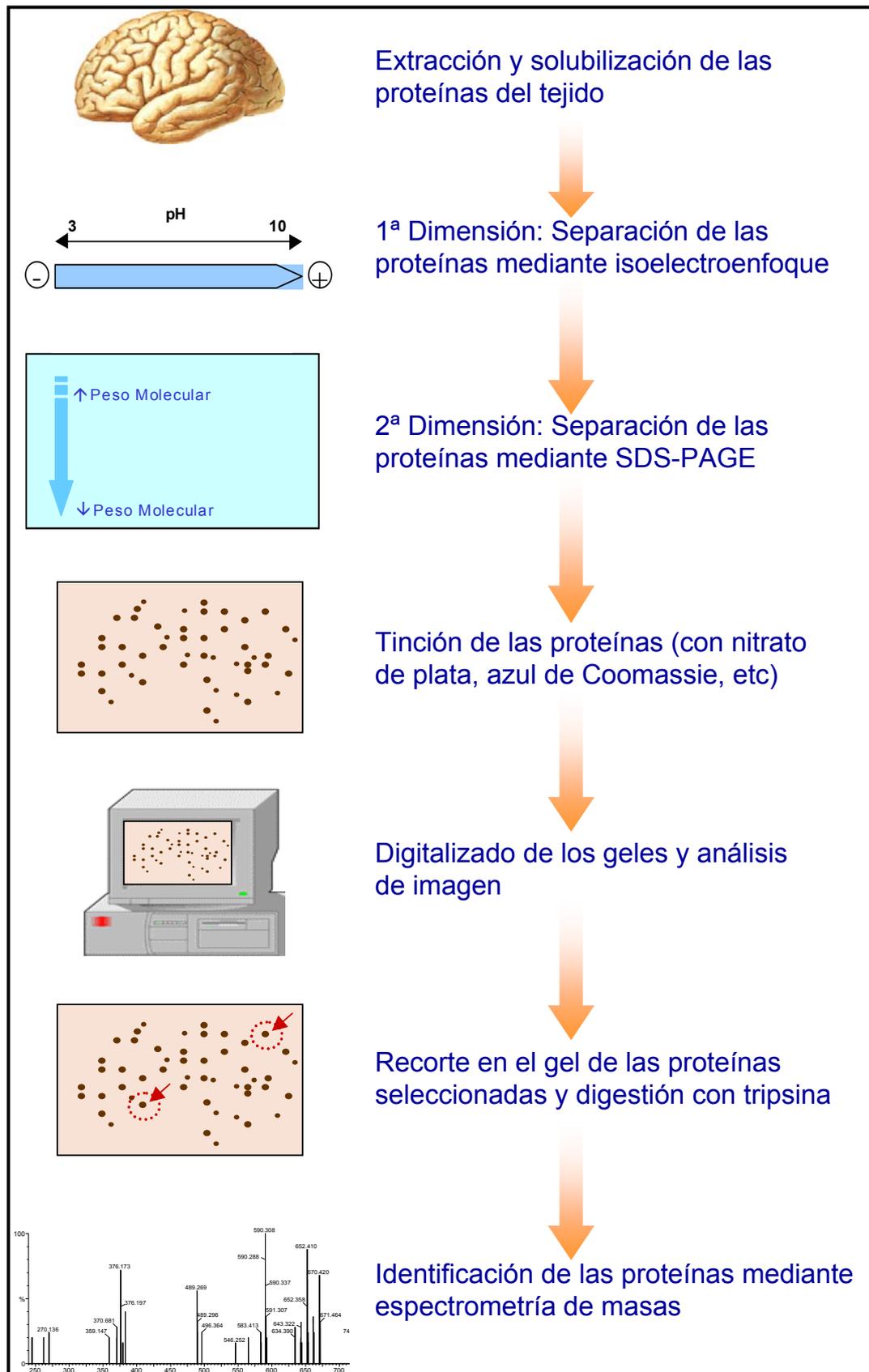


Figura 8: Pasos básicos en un estudio de Proteómica clásico.

5.2.1. Electroforesis bidimensional

A mediados de los años 70 O'Farrell y Klose desarrollaron de forma independiente la electroforesis bidimensional, una técnica de separación de proteínas de muy alta resolución, ya que permite la separación de miles de proteínas (Beranova-Giorgianni, 2003). En esta técnica las proteínas se separan atendiendo a dos propiedades independientes: punto isoeléctrico (valor de pH en el que la carga neta de la proteína es 0) y peso molecular. En la primera separación, o primera dimensión, las proteínas se separan según su punto isoeléctrico; a este procedimiento se le denomina también isoelectroenfoque y se realiza en tiras de gel con gradientes de pH inmovilizados (tiras IPG). En la segunda separación (segunda dimensión), las proteínas se separan atendiendo a su peso molecular. Esta separación se lleva a cabo en geles de poliacrilamida y en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS), por lo que, de forma abreviada, se denomina SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

Tras la separación de las proteínas es necesario teñir los geles para poder visualizar el mapa proteico obtenido. Este paso es de gran importancia en los ensayos proteómicos comparativos ya que el número de proteínas analizadas, la precisión de la cuantificación de los puntos y la compatibilidad a la hora de la identificación por espectrometría de masas, son parámetros imprescindibles para llevar a cabo con éxito el experimento (Chevalier y col. 2007). Se pueden realizar diferentes tipos de tinciones con distinto coste. Los tintes visibles convencionales son azul de Coomassie, azul de Coomassie coloidal y nitrato de plata, cada uno de ellos con distintas sensibilidades: 50, 10 y 0,5 ng de proteína detectable/punto respectivamente (Chevalier y col., 2007; Smejkal, 2004; Lane y Panfilov, 2005; Rabilloud, 1992; Neuhoff y col., 1990; Chevalier y col., 2004; Mortz y col., 2001; Jin y col., 2008) Por otro lado también se encuentran ampliamente utilizados tintes fluorescentes como Sypro Ruby, Flamingo o Deep Purple cuya sensibilidad es de 1 ng de proteína detectable/punto (Patton, 2002; Ball y Karuso, 2007; Lamanda y col., 2004; Berggren y col., 2002; Nebrich y col., 2005; Wheelock y Buckpitt, 2005; Maurer, 2006; Wheelock y Goto, 2006). El inconveniente principal de este tipo de tinciones es el elevado coste de su utilización.

El resultado final del proceso es un mapa bidimensional en el que cada punto suele corresponder a una única proteína. Estos mapas son finalmente digitalizados y analizados mediante programas informáticos especializados. Los mapas bidimensionales obtenidos a partir de diferentes muestras pueden compararse para buscar diferencias en la expresión proteica, por lo que esta técnica es fundamental para estudios de

“Proteómica de Expresión Diferencial” (Tilleman y col., 2002). Además, estos mapas se utilizan para caracterizar el proteoma de una célula, tejido u órgano (Kaji y col., 2000); esta información normalmente se incluye en bases de datos de acceso libre a través de Internet.

Las continuas modificaciones y mejoras de esta técnica la han convertido en un método eficaz y fiable; sin embargo, sigue presentando limitaciones (Lubec y col., 2003). Entre ellas una de las que más afecta al campo de la neurociencia, es su dificultad para separar proteínas hidrófobas, como las proteínas de membrana (entre las que se encuentran numerosos receptores), ya que no suelen ser solubles en la mayoría de los reactivos compatibles con la técnica. Otras proteínas de difícil detección son las de muy alto o muy bajo peso molecular y las poco abundantes (por ejemplo, el límite de detección de una proteína de 50 kDa teñida con plata es de 20 fmol). Tampoco se resuelven bien las proteínas muy ácidas o muy básicas. Por ello se han desarrollado nuevas técnicas alternativas a la electroforesis bidimensional en gel, como la cromatografía líquida bidimensional o la técnica ICAT (“isotope-coded affinity tags”). Estas técnicas, junto con otros avances de la metodología empleada en Proteómica, se comentarán más adelante. A pesar de estas limitaciones, la electroforesis bidimensional continúa siendo la técnica de separación más empleada en estudios de Proteómica ya que, entre otras cosas, es la única técnica que puede emplearse para hacer comparaciones cuantitativas de perfiles de expresión proteica de muestras complejas (> 1000 proteínas) (Scherp y col., 2010).

5.2.2. Espectrometría de masas.

Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de proteínas. Como paso previo las proteínas deben convertirse en péptidos, mediante proteólisis, generalmente con tripsina, ya que la masa de una proteína no es suficiente para identificarla. Tras esto el análisis implica fundamentalmente los siguientes pasos (Gil, 2003):

- 1) Conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización desorción con láser asistida con matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido, o la ionización mediante electrospray (ESI) de una muestra en solución.

- 2) Separación de los iones según su relación masa/carga (m/z) en un analizador de masas (por ejemplo un analizador tipo TOF -Time Of Flight-, cuadrupolo, trampa iónica, etc.)
- 3) Medida de las masas en un detector obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z .

Aunque se han desarrollado diversas combinaciones de fuentes de ionización y de analizadores de masas, la fuente MALDI se suele acoplar a un analizador tipo TOF mientras que la ionización mediante ESI normalmente se combina con un triple cuadrupolo, con una trampa iónica o con un híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF). También se han desarrollado fuentes de MALDI que se acoplan a un analizador Q-TOF o a dos analizadores TOF en tándem (MALDI-TOF-TOF).

Los espectrómetros de masas permiten identificar la proteína a través de la caracterización de dos parámetros (Beranova-Giorgianni, 2003; Gil, 2003). Uno es la huella peptídica (PMF: peptide mass fingerprinting) o mapeo peptídico, que implica la determinación de las masas de todos los péptidos y se obtiene habitualmente utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF. Estas masas peptídicas experimentales son comparadas con las masas peptídicas teóricas de proteínas presentes en bases de datos (como la SWISSPROT). Para ello se han desarrollado diversos algoritmos (PEPSEA, PROFOUND, MS-FIT, PEPTIDENT...) disponibles en Internet. Para la identificación correcta de la proteína se requiere que las masas de un gran número de péptidos coincidan con las masas teóricas de los péptidos y que cubran parte de la secuencia de la proteína de la base de datos.

Si la proteína no está anotada en las bases de datos o si la identificación es ambigua, la identificación de la proteína se realiza a través de otro parámetro denominado etiqueta de secuencia (sequence tag) (Beranova-Giorgianni, 2003; Gil, 2003), que es la secuencia parcial o total de los aminoácidos. Para obtenerla se selecciona un ión por la masa en un primer espectrómetro, se fragmenta por colisión con un gas y los fragmentos se analizan en un segundo espectrómetro. Para obtener etiquetas de secuencia se emplean espectrómetros de masas en tándem. Existen diversas herramientas bioinformáticas que se pueden utilizar para la interpretación de las etiquetas de secuencia (PEPSEA, SEQUEST, PEPFRAG, MSTAG y MASCOT).

5.2.3. Otras técnicas empleadas en Proteómica.

Las técnicas empleadas en Proteómica están en constante evolución ya que se están realizando importantes esfuerzos para superar las limitaciones de las técnicas disponibles. Así la técnica DIGE supone una mejora de la electroforesis bidimensional tradicional. En otros casos, se ha optado por no emplear geles; es el caso de la cromatografía líquida bidimensional, las técnicas de marcaje diferencial (ICAT, SILAC, iTRAQ), o los arrays de proteínas. Estos avances serán comentados brevemente; sin embargo, hay que tener en cuenta que, de momento, no existe un protocolo universal que pueda ser aplicado con éxito a todos los tipos de estudios.

DIGE (Differential gel electrophoresis)

Esta técnica ha sido implantada como método cuantitativo alternativo a la electroforeis bidimensional convencional (Barceló-Batllo y col., 2008) y ha supuesto un importante avance para estudios de expresión diferencial. En ella las proteínas procedentes de dos muestras distintas se marcan con dos fluorocromos diferentes, después se mezclan y se procesan en el mismo gel (Tongue y col., 2001). Este método ofrece mayor rendimiento que la electroforesis bidimensional convencional y facilita las comparaciones ya que elimina las variaciones en la migración de proteínas que son debidas a su separación en distintos geles. Además con este método se mejora la simplicidad y la precisión en el emparejamiento de los puntos (Xiao y col., 2010).

Cromatografía líquida bidimensional

Para no tener las limitaciones asociadas a los geles en la separación y caracterización de las proteínas, se han llevado a cabo aproximaciones multidimensionales utilizando cromatografía líquida bidimensional (columna de intercambio iónico y columna de fase reversa), seguida de un análisis de los péptidos mediante espectrometría de masas (MudPIT: multidimensional protein identification technology). En dicha aproximación se requiere realizar la digestión de las proteínas antes de la separación primero por su carga y posteriormente por su hidrofobicidad. Este método permite la separación e identificación de cientos de proteínas en un solo experimento (Washburn y col., 2001).

ICAT ("isotope-coded affinity tags")

Otra técnica que surgió como alternativa a los geles bidimensionales ya que es especialmente útil para los estudios de expresión diferencial es la denominada ICAT ("isotope-coded affinity tags"; Gigy y col., 1999). Esta técnica determina la cantidad relativa de una proteína entre dos muestras (Kang y col., 2010). Para ello, las proteínas procedentes de dos muestras distintas son marcadas con el reactivo ICAT ligero o pesado (según lleve hidrógeno o deuterio), el cual se une a las cisteínas. Posteriormente las muestras se mezclan y se digieren con tripsina. Los péptidos anteriormente marcados con el reactivo ICAT se separan en una columna de afinidad y posteriormente son analizados por espectrometría de masas. La intensidad relativa de los péptidos idénticos de cada muestra (se diferencian en una masa de 8 Dalton) refleja la abundancia de la proteína de la que provienen. Mediante la fragmentación del péptido por MS/MS se identifica la proteína en estudio. Es uno de los ensayos de marcación con isótopos más empleado en proteómica y fue el primer método cuantitativo basado únicamente en el espectrometría de masas (Chaerkady y Pandey, 2008).

SILAC (Stable Isotope-Labeling with Amino acids in Cell culture)

Otro método desarrollado recientemente es SILAC ("Stable Isotope-Labeling with Amino acids in Cell culture"). Consiste en marcar las proteínas sintetizadas "de novo" por las células con isótopos estables, no radiactivos, de aminoácidos que se utilizan en los procesos metabólicos corrientes (Gruhler y Kratchmarova, 2008). La disponibilidad de gran cantidad de isótopos distintos para marcar los aminoácidos permite hacer comparaciones entre 2 o 3 poblaciones celulares distintas en un único SILAC. Además, es el único método proteómico cuantitativo que permite el marcaje de las células *in vivo* (Alex y col., 2009).

iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification)

Esta técnica es muy útil para comparar la abundancia de una proteína en hasta 8 muestras distintas en un único experimento (Pan y Aebersold, 2007). Las muestras se digieren con tripsina y los péptidos obtenidos se marcan con isótopos estables, los cuales se unen a dichos péptidos por las aminas primarias de los mismos. Cuando se someten a la fragmentación de los péptidos mediante MS/MS, se rompen fácilmente en dos partes, una de las cuales es una diamina cíclica cargada, que es un excelente ion marcador de la parte de menor masa para realizar la cuantificación relativa de los péptidos. Este método

se ha utilizado tanto para el estudio de tejidos (Martin y col., 2008) como para el de cultivos celulares (Bantscheff y col., 2008).

Arrays de proteínas

Los arrays de proteínas son sistemas de fase sólida con ligandos de unión que permiten inmovilizar proteínas, péptidos, fragmentos de proteínas o anticuerpos sobre soportes de cristal, membranas de celulosa, platos de espectrometría de masas o micro/nanopartículas (Al-Tarawneh y Bencharit, 2009). Esta técnica ha avanzado notablemente en los últimos años. Un ejemplo de estos avances son los microarrays funcionales de proteínas que se componen de arrays con proteínas o dominios funcionales completos (como quinasas o citoquinas) y se pueden usar en el estudio de las actividades bioquímicas de una determinada clase de proteínas o de proteomas completos, en un único experimento (Hall y Snyder, 2007) Otro ejemplo, son los microarrays de proteínas de fase reversa en los cuales, sobre la superficie de los soportes se impregnan minúsculas cantidades de material biológico de lisado celular o de un tejido. A continuación se incuban con anticuerpos marcados contra la proteína de interés. Los analitos obtenidos pueden ser detectados utilizando métodos de amplificación o con anticuerpos secundarios marcados (Aguilar-Mahecha y col., 2009).

5.3. Aplicación de las técnicas de Proteómica al estudio de la adicción a drogas de abuso

En general, las enfermedades neuropsiquiátricas, entre las que se encuentra la adicción a drogas, carecen de diagnósticos sencillos y precisos así como de tratamientos eficaces. En este sentido, la Proteómica ofrece un gran potencial, ya que los estudios de expresión diferencial permiten, sin partir de hipótesis previas, caracterizar proteínas implicadas en estas patologías que podrían emplearse como marcadores de diagnóstico o como dianas terapéuticas. Con este objetivo se vienen realizando proyectos de investigación desde hace unos años que ya han proporcionado datos interesantes para el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en varias enfermedades neuropsiquiátricas como la enfermedad de Alzheimer, la depresión, la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson, entre otras (Alguacil y col, 2006).

La exposición repetida a drogas de abuso causa cambios neuroadaptativos dependientes del tiempo en el sistema mesocorticolímbico del cerebro que, como se ha explicado anteriormente, está implicado en los procesos de dependencia a las drogas de abuso. Por ello, uno de los principales objetivos de los ensayos proteómicos con drogas

de abuso consiste en identificar las proteínas implicadas en dichos cambios. Cuando a principios del 2006 se iniciaron los estudios de esta Tesis doctoral apenas existían referencias bibliográficas sobre este tema y todas ellas se centraban en el estudio de los efectos de la administración pasiva de drogas, al margen por tanto de los modelos conductuales de drogadicción (Williams y col., 2004; Kim y col., 2004, 2005; Yeom y col., 2005; Prokai y col., 2005). Sin embargo, en los últimos 4-5 años la aplicación de la Proteómica al estudio de los efectos producidos por las drogas de abuso ha aumentado considerablemente. A continuación se resumen algunos de los trabajos más interesantes.

En 2007 Hwang y Li realizaron estudios de Proteómica sobre distintas áreas cerebrales (amígdala, NAcc, CPF, estriado y ATV) de ratas que habían recibido nicotina durante 7 días a través de bombas de infusión osmóticas. Encontraron diferencias significativas en la expresión de múltiples proteínas en todos los núcleos cerebrales estudiados. Otro estudio más reciente realizado sobre suero sanguíneo de ratas en diferentes estadios de la adicción a nicotina (autoadministración, abstinencia, extinción y recaída) muestra diferencias en la expresión de diversas proteínas, demostrando cómo el patrón de consumo puede repercutir sobre los niveles de ciertas proteínas en el plasma (Cecconi y col., 2008).

En lo referente a la adicción a alcohol, Lewohl y col., (2004), realizaron un estudio proteómico de corteza frontal de humanos que habían abusado del alcohol durante un largo periodo de tiempo y detectaron diferencias importantes en la expresión de 139 proteínas. Otro estudio ha encontrado diferencias en la expresión de ciertas proteínas al comparar la región dorsolateral prefrontal de la materia blanca de humanos en distintas fases de la adicción: alcohólicos, alcohólicos con cirrosis hepática y alcohólicos deshabitados. (Alexander-Kaufman y col., 2006). Finalmente, estudios recientes en el cuerpo calloso de alcohólicos con enfermedades hepáticas derivadas de la ingesta abusiva de alcohol, muestran diferencias en la expresión de múltiples proteínas (Kashem y col., 2008)

Otra droga de abuso sobre cuyos efectos se han realizado estudios de Proteómica es la metaanfetamina. Kobeissy y colaboradores (2009) identificaron 82 proteínas que habían mostrado diferencias en la expresión de la corteza de ratas tratadas con esta sustancia de forma aguda. Faure y colaboradores (2009) encontraron cambios en la expresión de proteínas de la corteza prefrontal de ratas tratadas con esta droga durante 8 días. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional, se hallaron diferencias significativas en la abundancia de 42 proteínas citosólicas y 47 de

membrana. Estas proteínas se identificaron por espectrometría de masas y se observó que estaban relacionadas con la degradación de proteínas, regulación redox, metabolismo energético, crecimiento celular, modificaciones del citoesqueleto y función sináptica. Otros autores realizaron ensayos de proteómica en diversos núcleos cerebrales de ratas que habían sido sometidas a ensayos de condicionamiento preferencial al sitio inducido por metanfetamina encontrando diferencias en la expresión de múltiples proteínas relacionadas con el citoesqueleto, transporte de sustancias y la traducción de señales (Yang y col., 2008).

En lo que respecta a la aplicación de la Proteómica al estudio de los efectos de la cocaína, el primer trabajo publicado fue el de Reynolds y colaboradores (2006), que investigaron el efecto de la cocaína sobre los proteomas de astrocitos de enfermos infectados con HIV-1 respecto a sujetos sanos. Posteriormente otros autores se han centrado en el estudio de las alteraciones proteómicas que se observan en la abstinencia de cocaína; así Geng y col., 2006 utilizaron la espectrometría de masas como herramienta para el estudio de los cambios en la expresión de proteínas de cerebro de ratas en periodo de abstinencia tras un consumo continuado de cocaína. Más recientemente, otros autores han analizado las alteraciones en la expresión de proteínas en la CPF de la rata tras periodos prolongados de abstinencia y han demostrado que, si bien hay proteínas cuyos cambios revierten en un tiempo relativamente corto (como la HSP73 o la γ -actina) en otras proteínas, como la proteína relacionada con la dihidropirimidasa-2 o la α -internexina, los cambios persisten durante más de 100 días (Lull y col., 2009). Por otro lado, también hay datos de estudios realizados en humanos, en concreto Tannu y colaboradores (2007), compararon el NAcc de víctimas de sobredosis de cocaína con el de sujetos control y detectaron diferencias en la expresión de 18 proteínas entre las que se encuentran la liprina β 3, la β -tubulina o la peroxirredoxina-2. Finalmente, en la bibliografía también se pueden encontrar estudios realizados sobre modelos comportamentales más complejos. Por ejemplo, en un estudio se analizó la corteza orbitofrontal de monos *rhesus* que mostraban alteraciones cognitivas producidas por el tratamiento con cocaína (Olausson y col. 2007) y en otro más reciente se estudió el NAcc de monos *rhesus* entrenados para autoadministrarse cocaína (Tannu y col., 2010); en ambos casos la mayor parte de las proteínas identificadas están implicadas en el mantenimiento de la estructura celular, en la traducción de señales o en el metabolismo mitocondrial.

En lo que respecta a la morfina, en la actualidad podemos encontrar estudios de Proteómica realizados sobre cultivos celulares expuestos a la droga o sobre animales

que han recibido diferentes tratamientos con el opiáceo o que han sido sometidos a paradigmas comportamentales. Entre los primeros destaca el realizado con neuronas del núcleo estriado tratadas con morfina, que se compararon con cultivos control; encontrándose diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, estrés oxidativo, biosíntesis de proteínas, citoesqueleto y chaperonas (Bodzon-Kulakowska y col., 2009). Uno de los primeros y más completos estudios realizados *in vivo* es el de Bierzynska-Krzysik y colaboradores (2006). Dichos autores implantaron (s.c.) un pellet de morfina en ratas; tres días después sacrificaron a los animales e hicieron un análisis proteómico de la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado, encontrando diferencias en la expresión de 26 proteínas. En 2006 Li y colaboradores realizaron un estudio del proteoma del NAcc de ratas expuestas a un consumo crónico e intermitente de morfina, y describieron cambios en la expresión de múltiples proteínas, principalmente relacionadas con el metabolismo energético. En concordancia con estos resultados, Chen y colaboradores (2007) demostraron que el tratamiento crónico con morfina producía una reducción en la expresión de tres enzimas metabólicas en hipocampo, lo cual contribuía al desarrollo del síndrome de abstinencia y de las alteraciones de la memoria inducidas por el opiáceo. Otros autores evaluaron el proteoma del ganglio dorsal de ratas abstinentes de morfina (Li y col., 2009). Al comparar el grupo de ratas tratadas con el control, obtuvieron diferencias en múltiples proteínas de las cuales se consiguió identificar correctamente 12. Como en los estudios anteriores, la mayoría fueron enzimas implicadas en el metabolismo energético, pero también encontraron diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con la degradación proteica, la señalización celular o el citoesqueleto. Finalmente, resulta especialmente interesante el trabajo de Yang y colaboradores (2007). Dichos autores realizaron estudios de electroforesis bidimensional con la corteza prefrontal de ratas obtenidas tras el ensayo de condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina y obtuvieron diferencias significativas en la expresión de 80 proteínas al comparar los proteomas de animales en distintas fases del ensayo: adquisición, extinción y recaída.

Otro aspecto interesante para el que también resulta de gran utilidad el empleo de técnicas de Proteómica es el estudio de las modificaciones post-traduccionales derivadas de la exposición a drogas de abuso. Una vez finalizado el proceso de traducción, las proteínas pueden sufrir cambios en su estructura que son denominados modificaciones post-traduccionales. Las modificaciones post-traduccionales más comunes son la fosforilación, oxidación, amidación, glicosilación y alquilación (Jenkins, 2007). Dichas modificaciones afectan al plegamiento, conformación, estabilidad, función y actividad de las proteínas y pueden además influir en su localización, su degradación y

en la interacción con otras proteínas (Morrison y col., 2002). De hecho varias patologías, como el cáncer, la diabetes o las enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con fallos en este tipo de modificaciones (Sinchaikul y col., 2008; Petyuk y col., 2008; Wei y Li, 2009). La fosforilación es la modificación post-trasduccional más frecuente, de forma que al menos un tercio de las proteínas existentes la sufren en algún momento (Zolnierowicz y col., 2000), y se sabe que drogas de abuso como la cocaína o la morfina, producen alteraciones en cascadas de señalización intracelular que afectan a la fosforilación de diversas proteínas (Nestler, 2001; Xu y col., 2004); por ello, la caracterización del fosfoproteoma cerebral y de sus alteraciones derivadas de la exposición a drogas puede ser clave para establecer los mecanismos moleculares implicados en las drogodependencias. Sin embargo, por el momento, la Proteómica se ha empleado con este fin en contadas ocasiones. Por ejemplo, Kim y colaboradores (2005, 2006) analizaron el fosfoproteoma de la corteza cerebral de ratas dependientes de los opiáceos butorfanol y morfina y encontraron alteraciones en 65 y 40 fosfoproteínas, respectivamente; y Tannu y colaboradores (2010) describieron alteraciones en 15 fosfoproteínas en el NAcc de monos que se autoadministraban cocaína.

En resumen, si bien la aplicación de la Proteómica al estudio de las drogodependencias se ha ampliado considerablemente en los últimos 4-5 años, no existen hasta el momento estudios proteómicos en modelos experimentales específicos de vulnerabilidad diferencial a los efectos de las drogas, por ello en el presente trabajo los estudios de Proteómica se centraran en dichos modelos, lo que constituye a nuestro juicio una aproximación indispensable para progresar en el conocimiento de los mecanismos biológicos implicados en la adicción.

I. OBJETIVOS

El conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la distinta vulnerabilidad para desarrollar o mantener conductas adictivas puede ser de gran utilidad para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas destinadas a la prevención o al tratamiento de las drogodependencias. En esta Tesis pretendemos ampliar dicho conocimiento mediante la identificación de marcadores proteicos de susceptibilidad a la adicción a drogas de abuso, empleando modelos animales de vulnerabilidad diferencial. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Poner a punto en nuestras condiciones experimentales un modelo, basado en el test del condicionamiento preferencial al sitio, que nos permita clasificar ratas Sprague-Dawley en dos subpoblaciones atendiendo a la velocidad de extinción de la preferencia espacial inducida por cocaína o morfina.
2. Comparar, mediante técnicas de Proteómica, el perfil de expresión proteica del núcleo accumbens y de la corteza prefrontal de animales con distinta velocidad de extinción de la conducta de búsqueda de cocaína o morfina, tanto en condiciones basales como tras la administración aguda de la droga.
3. Estudiar las variaciones del fosfoproteoma del núcleo accumbens de ratas con diferente velocidad de extinción de la conducta de búsqueda de cocaína o morfina.
4. Comparar, mediante técnicas de Proteómica, el perfil de expresión proteica del núcleo accumbens y de la corteza prefrontal de ratas Fischer-344 y Lewis, tanto en condiciones basales como tras la administración aguda de cocaína o morfina.
5. Establecer correlaciones entre los resultados obtenidos en el modelo de preferencia espacial inducido por morfina o cocaína y el modelo de ratas Fischer-344 y Lewis.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales.

Para los ensayos de condicionamiento preferencial al sitio se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de 8 semanas de edad (300-350 g) criadas en el animalario de la Universidad CEU -San Pablo. Estos animales fueron alimentados con dieta sólida estándar (RMM, Harlan Interfauna Iberica, España). Para los experimentos de administración aguda, se emplearon ratas macho Fischer (F344) y Lewis de 7 semanas y media de edad (110 y 130 g) (Harlan, España).

Todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida y se estabularon en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (45-55%), con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (8-20 h). Los animales adquiridos en el exterior tuvieron un periodo de adaptación al animalario de al menos 4 días antes del comienzo de los ensayos. El alojamiento y la utilización de los animales se llevaron a cabo bajo la normativa vigente (Directiva 86/609/CEE, RD 1201/2005) y los protocolos experimentales fueron además aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo.

2. Extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por drogas.

Para el estudio del refuerzo positivo inducido por la administración tanto de cocaína como de morfina, se empleó el método del condicionamiento espacial, un protocolo ampliamente utilizado para evaluar tanto el potencial adictivo de los fármacos como sus efectos disfóricos. El proceso experimental del condicionamiento al sitio se basó en los trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Morales y col., 2007).

Se utilizó un laberinto de metacrilato negro formado por dos brazos rectangulares de igual tamaño (40 x 35x 35 cm) unidos a través de una puerta de guillotina (figura 9). Cada compartimento difería en los colores o textura de suelo y paredes, de forma que los animales fueron capaces de distinguirlos; en uno de ellos el suelo se cubrió de viruta de maíz y las paredes estaban marcadas con rayas blancas, mientras que en el otro se mantuvo el suelo de metacrilato negro y en las paredes se dibujaron círculos blancos. El laberinto se mantuvo en una habitación aislada mantenida a temperatura constante.



Figura 9: Laberinto empleado en los ensayos de comportamiento.

2.1. Extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína.

Este ensayo se llevó a cabo durante 10 días y constó de las fases de precondicionamiento, condicionamiento, libre elección y extinción. La figura 10 muestra un esquema de las partes del ensayo de la extinción del comportamiento de búsqueda inducido por cocaína.

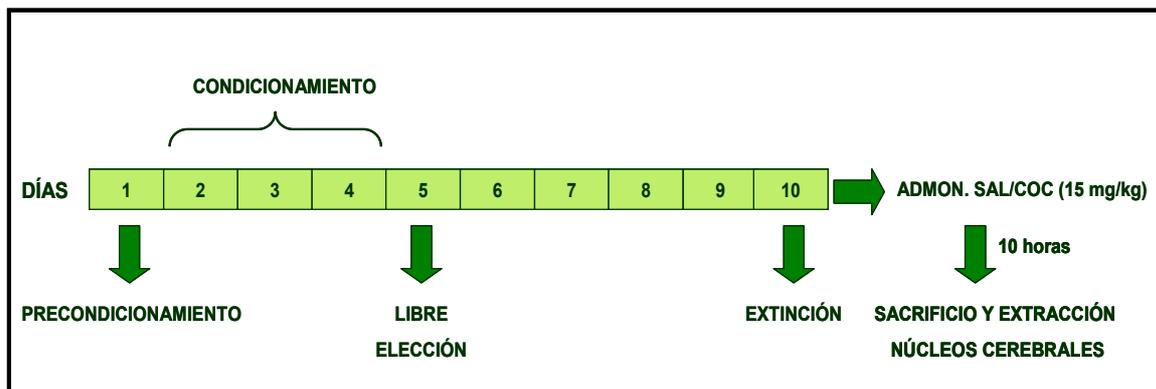


Figura 10: Fases del estudio de la extinción de la preferencia espacial inducida por cocaína.

2.1.1. Precondicionamiento

Para examinar la conducta espontánea de los animales (basal), se dejaron circular libremente por el laberinto durante 30 minutos. El recorrido del animal fue registrado a través de un sistema de videotracking (San Diego Instrument, EEUU) que permitió calcular automáticamente el tiempo de estancia de los animales en cada uno de los dos

brazos. De esta manera los animales que presentaban una excesiva preferencia por alguno de los brazos (estancia mayor del 60% de la sesión) eran descartados. Los animales seleccionados se distribuyeron aleatoriamente en los distintos grupos de tratamiento de manera que el tiempo medio de permanencia en cada brazo fuese similar en todos los grupos. Después, arbitrariamente y para cada animal, se asoció un brazo a la administración de cocaína y otro a la administración del vehículo, suero salino.

2.1.2. Condicionamiento

Esta parte del ensayo comprendió de tres días de sesiones dobles (una de mañana y otra de tarde). El primer día por la mañana los animales que fueron seleccionados recibieron una administración de suero por vía intraperitoneal (i.p) con un volumen de administración de 1ml/kg y se confinaron inmediatamente en el brazo asociado durante 30 minutos. Por la tarde las ratas se trataron con cocaína (15 mg/kg, i.p.) y se confinaron al compartimento asociado durante otros 30 minutos, de tal forma que cada animal fue su propio control. Se mantuvo un intervalo de al menos 3 horas desde la sesión de mañana y tarde. En los dos días siguientes se realizó el mismo procedimiento pero el orden de los tratamientos (mañana/tarde) se alternó para evitar la influencia del ritmo circadiano.

2.1.3. Libre elección

El día 5 los animales pudieron circular libremente por el laberinto en las mismas condiciones que en la fase de preconditionamiento. El tiempo de permanencia en cada brazo se registró de nuevo automáticamente para cada rata. Para evaluar la preferencia al sitio inducida por la administración de cocaína, se compararon estadísticamente los tiempos de estancia en el compartimento asociado a dicho tratamiento respecto al día de la libre elección, mediante el test de la t de Student.

2.1.4. Fase de extinción

El objetivo de esta fase fue separar a los animales en dos subpoblaciones, en función de su velocidad de extinción del condicionamiento al sitio. Por lo que, con este ensayo no se pretendió extinguir en toda las ratas el comportamiento de búsqueda, sino dividir las según su grado de vulnerabilidad a los efectos reforzadores de las drogas de abuso (Itzhak y Martin, 2002).

Los días 6, 7, 8 y 9 los animales que habían presentado en la fase de libre elección tiempos de estancia superiores al 60% del tiempo total de la sesión en el brazo asociado

a la administración de cocaína, permanecieron alojados en sus jaulas (fase pasiva de extinción). En el día 10, se les permitió de nuevo circular libremente por todo el recinto, en idénticas condiciones que en los días de acondicionamiento y libre elección quedando de esta forma divididos de forma homogénea en dos grupos:

- Animales que **extinguían** el comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína (E), debido a que su tiempo de estancia en dicho brazo se igualó al obtenido en el día de acondicionamiento (basal).
- Animales que **no extinguían** la preferencia al sitio inducido por cocaína (NE), debido a que su tiempo de estancia en dicho brazo no varió significativamente respecto al de la libre elección.

A continuación se les administró cocaína 15 mg/kg (COC) o bien suero salino (SAL) por i.p (1 ml/kg), de forma que los grupos experimentales que finalmente quedaron establecidos como se resumen en la tabla 1:

Tabla 1: Grupos de animales obtenidos en el ensayo de extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína.

	TRATAMIENTO	Grupo experimental	n
EXTINGUEN	SALINO	E SAL	13
	COCAÍNA (15mg/kg)	E COC	14
NO EXTINGUEN	SALINO	NE SAL	11
	COCAÍNA (15mg/kg)	NE COC	12

Transcurridas 10 horas desde la administración bien de cocaína o bien de suero los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron el NAcc y la CPF, según el protocolo descrito por Heimer y colaboradores (1991). Dichos núcleos se conservaron a -80° C hasta su procesamiento.

2.2. Extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina.

Este ensayo se realizó durante 8 días y constó de las mismas fases que el anteriormente comentado: acondicionamiento, condicionamiento, libre elección y

extinción. La figura 11 muestra un esquema de las partes del estudio de la extinción del comportamiento de búsqueda inducido por morfina.

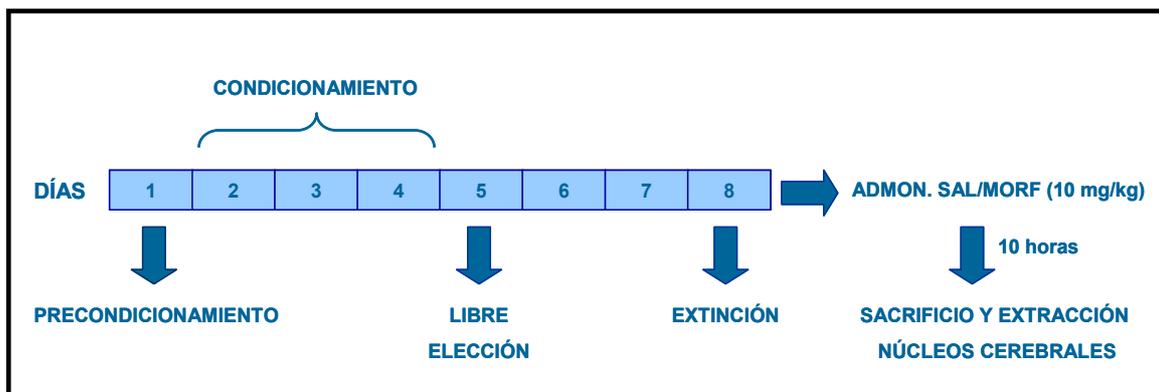


Figura 11: Fases del estudio de la extinción de la preferencia espacial inducida por morfina.

Tanto la fase de acondicionamiento como la de libre elección se llevaron a cabo exactamente igual que en el condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína (aparatados 2.1.1 y 2.1.3 respectivamente). En la fase de condicionamiento, los animales se trataron con morfina a la dosis de 10 mg/Kg y se mantuvieron las condiciones experimentales descritas en el apartado 2.1.2.

2.2.1. Fase de extinción.

Los días 6 y 7 los animales que habían presentado en la fase de libre elección tiempos de estancia superiores al 60% del tiempo total de la sesión en el brazo asociado a la administración de morfina, permanecieron alojados en sus jaulas (fase pasiva de extinción). En el día 8 se les permitió de nuevo circular libremente por todo el recinto, en idénticas condiciones que en los días de acondicionamiento y libre elección consiguiendo de esta manera dos grupos:

- Animales que **extinguían** el comportamiento de preferencial al sitio inducido por morfina (E), debido a que su tiempo de estancia en el brazo asociado a la droga se igualó al obtenido en el día de acondicionamiento (basal).
- Animales que **no extinguían** la preferencia al sitio inducido por morfina (NE), debido a que tiempo de estancia en el brazo asociado a la droga no varió significativamente respecto al de la libre elección.

A continuación se les administró morfina 10 mg/kg (MOR) o bien suero salino (SAL) por vía i.p (1 ml/kg), de forma que los grupos experimentales que finalmente quedaron establecidos se resumen en la tabla 2:

Tabla 2: Grupos de animales obtenidos en el ensayo de extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina.

	TRATAMIENTO	Grupo experimental	n
EXTINGUEN	SALINO	E SAL	12
	MORFINA (10mg/kg)	E MOR	13
NO EXTINGUEN	SALINO	NE SAL	11
	MORFINA (10mg/kg)	NE MOR	14

Transcurridas 10 horas desde la administración bien de morfina o bien de suero fisiológico los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron el NAcc y la CPF, según el protocolo descrito por Heimer y colaboradores (1991). Dichos núcleos se conservaron a -80° C hasta su procesamiento.

3. Estudio comparativo entre ratas F344 y Lewis.

Se utilizaron treinta y seis animales en total, dieciocho ratas de la cepa F344 y dieciocho de la cepa Lewis. Durante los cinco días previos al tratamiento, los animales recibieron una administración diaria de suero fisiológico (1 ml/kg, i.p.) para habituarles a la manipulación. El día del experimento, los animales recibieron una única administración (i.p. 1ml /kg) de cocaína (15 mg/kg), morfina (10 mg/kg) o salino (grupo control) según muestra la figura 12.

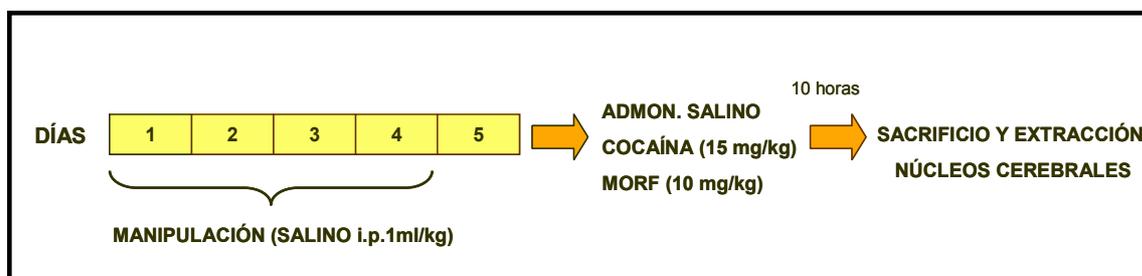


Figura 12: Fases del ensayo del estudio comparativo de los efectos de morfina o cocaína en ratas Lewis y F344.

De esta forma, quedaron establecidos 6 grupos de tratamiento tal y como muestra la tabla 3.

Tabla 3: Grupos experimentales del estudio comparativo entre ratas Lewis y F344

CEPA	TRATAMIENTO	Grupo experimental	n
F344	SALINO	F SAL	6
	COCAÍNA (15mg/kg)	F COC	6
	MORFINA (10mg/kg)	F MOR	6
LEWIS	SALINO	L SAL	6
	COCAÍNA (15mg/kg)	L COC	6
	MORFINA (10mg/kg)	L MOR	6

Transcurridas 10 horas desde la administración de morfina, de cocaína o bien de suero fisiológico los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron el NAcc y la CPF según el protocolo descrito por Heimer y colaboradores (1991). Dichos núcleos se conservaron a -80° C hasta su procesamiento.

4. Análisis proteómico del núcleo accumbens y corteza prefrontal de la rata.

El estudio del proteoma del NAcc y CPF de la rata se realizó a través de las siguientes fases. En primer lugar se realizó una extracción y purificación de las proteínas de la muestra. Después, las proteínas se separaron mediante electroforesis bidimensional atendiendo a dos de sus propiedades: primero según su punto isoeléctrico (pI), mediante isoelectroenfoque (primera dimensión); y después según su peso molecular, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE o segunda dimensión). Posteriormente, para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con nitrato de plata o azul de Coomassie coloidal. Tras densitometrar los geles, se realizó un análisis informático de la imagen de los mismos con el fin de detectar las proteínas cuya expresión variaba significativamente al comparar los distintos grupos. Finalmente, las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas.

En función de la cantidad de muestra que se vaya a separar en un gel bidimensional, las electroforesis se dividen en analíticas o preparativas. En las electroforesis analíticas

se carga poca cantidad de proteína, en nuestro caso 80 μg , los geles se tiñen con nitrato de plata y sirven para realizar el análisis de imagen y detectar las variaciones significativas en la expresión de proteínas. En las electroforesis preparativas, se carga mucha más cantidad de proteína, 500 μg en nuestro caso, los geles se tiñen con azul Coomassie coloidal y se utilizan para poder aislar las proteínas que se van a utilizar para identificar por espectrometría de masas.

A continuación se detallan los protocolos empleados en cada una de estas fases.

4.1. Extracción y purificación de las proteínas de la muestra.

Para extraer las proteínas de la muestra se utilizó el kit de extracción “Protein Extration Kit” (Bio-Rad, EEUU), cuya solución de extracción es fuertemente caotrópica ya que contiene el detergente ASB-14, lo que lo convierte en un potente agente solubilizador. Con este kit se consigue la extracción tanto de proteínas de membrana como citosólicas. Se siguió el protocolo descrito por el fabricante con las siguientes modificaciones: se utilizó un inhibidor de proteasas en una concentración del 0,01% (Amersham, EEUU); la homogeneización del tejido se llevó a cabo mediante sonicación, con Sonicador UP 200s con sonda de 3mm (Dr. Hielscher, Alemania) durante 30 segundos con una amplitud de 80 y 0,5 ciclos.

A continuación se midió la concentración de proteínas extraídas de la muestra. Para ello se empleó el kit “RC DC Protein Assay” (Bio-Rad, E.E.U.U.). Este método, a diferencia de otros como el Bradford o el Lowry, es compatible con los agentes reductores y con los detergentes utilizados en la extracción de las proteínas.

Finalmente, se utilizó el kit “ReadyPrep 2-D Cleanup” Kit (Bio-Rad, E.E.U.U) con el fin de eliminar detergentes iónicos, sales, ácidos nucleicos o lípidos, ya que pueden interferir en la electroforesis bidimensional. Además con este kit se consigue la precipitación total de todas las proteínas, lo cual puede ser muy útil en muestras demasiado diluidas. Posteriormente, para la resuspensión de las mismas se usó el volumen adecuado del buffer de rehidratación para conseguir una concentración final de 0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (para las electroforesis analíticas) o de 1,67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (para las electroforesis preparativas). La composición de dicho buffer fue la siguiente: urea (Bio-Rad, EEUU) 7M, tiourea (Sigma, Alemania) 2M, CHAPS (Sigma, Alemania) al 4%, DTT (Bio-Rad, EEUU) 50 mM, anfolito Bio-Lyte (Bio-Rad, EEUU) al 0,2% y trazas de Azul de bromofenol (Bio-Rad, EEUU).

4.2. Isoelectroenfoque (IEF): 1ª Dimensión.

Se cargaron 300 µl de la muestra en cada pocillo de la bandeja de IEF; a continuación, cada muestra se cubrió con una tira IPG de 17 cm con un rango de pH de 3 a 10 no lineal (Bio-Rad, EEUU). Transcurridos 20 minutos, todas las tiras se cubrieron con 2,5 mL de aceite mineral (Bio-Rad, EEUU) para evitar la evaporación de la muestra durante el IEF.

La bandeja se introdujo en la fuente de IEF "Protean IEF Cell" (Bio-Rad, EEUU) donde las tiras se sometieron inicialmente a un proceso de rehidratación activa a 50 V, 20° C, durante 12 horas. Inmediatamente después, el voltaje se aumentó de forma rápida hasta 10000V y se mantuvo hasta alcanzar un total de 60000 V/hr.

Una vez realizado el IEF, antes de realizar la segunda dimensión, las tiras se equilibraron en dos pasos. En el primero de ellos las tiras se agitaron durante 10 minutos en 2 mL de una disolución que contenía urea al 36%, SDS (Bio-Rad, EEUU) al 2 %, 1,5 M Tris HCl pH 8,8 al 25 %, glicerol (Panreac, España) al 20% y DTT al 0,5 %. En el segundo paso las tiras se agitaron de nuevo durante 10 minutos en 2 mL de una solución idéntica a la del paso anterior salvo que el DTT se sustituyó por iodoacetamida (Sigma, Alemania) al 0,75%.

4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE): 2ª Dimensión.

Para la segunda dimensión se emplearon geles de 200x205x1 mm que se prepararon en la cubeta "Protean Plus Multi-Casting Chamber" (Bio-Rad, E.E.U.U.) la cual permite la preparación de 12 geles a la vez. La composición de los mismos fue: acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad, EEUU) al 12%, 1,5 M HCl pH 8,8 al 25%, amonio persulfato (Bio-Rad, EEUU) al 0,2% y TEMED (Bio-Rad, EEUU) al 0,033%.

Las tiras IPG se sellaron a la parte superior de los geles utilizando una solución de agarosa LM (Pronadisa, España) al 1% con trazas de azul de bromofenol.

Una vez solidificada la agarosa los cristales se colocaron en la cubeta "Protean Plus Dodeca Cell" (Bio-Rad, EEUU). Esta cubeta permite realizar la electroforesis de 12 geles a la vez, lo cual disminuye la variabilidad entre geles que es debida a las diferentes

condiciones de manipulación. La electroforesis se realizó en un voltaje fijo de 200 V durante 6 horas.

4.4. Tinción de los geles.

4.4.1. Tinción con plata.

Para la tinción con plata se empleó el “Dodeca Silver Stain Kit” (Bio-Rad, EEUU) que permite la detección de niveles muy bajos (nanogramos) de proteínas en los geles de poliacrilamida. Este método de tinción está inspirado en el método descrito por Sinha y col. (2001) en el cual las uniones de las proteínas con los iones de plata se reducen químicamente para formar plata metálica visible. Este tipo de tinción se utilizó para posteriormente realizar el análisis de imagen de los geles analíticos. Todo el proceso se llevó a cabo en la cubeta de tinción Dodeca Stainer” (Bio-Rad, EEUU) bajo agitación moderada. Este sistema permite teñir 12 geles a la vez, lo cual contribuye una vez más, a disminuir la variabilidad de los geles debida a la manipulación. Los geles se sumergieron durante toda la noche en una solución de fijación compuesta por etanol absoluto (Panreac, España) al 40% y ácido acético (Scharlan, España) al 10%. Tras eliminar la solución de fijación, se añadió la solución de sensibilización durante 30 minutos. La composición de dicha solución fue Sensitizer Concentrate al 10% del kit “Dodeca Silver Stain” (Bio-Rad, EEUU), Background Reducer Concentrate al 1% del mismo kit y etanol absoluto al 30%. Después de retirar la solución de sensibilización, se realizaron tres lavados con agua Milli-Q de 10 minutos cada uno. A continuación, se añadió la solución de tinción durante 30 minutos. La composición de dicha solución fue Silver Reagent Concentrate al 2% del kit “Dodeca Silver Stain”. Tras retirar la solución de tinción los geles se lavaron con agua Milli Q durante 1 minuto. Después se añadió la solución de revelado hasta obtener el grado de tinción deseado. El tiempo medio de revelado fue de 8 minutos. La solución de revelado estaba compuesta por los reactivos del kit “Dodeca Silver Stain” y su cantidad que se detallan a continuación: Development Buffer Concentrate al 10%, del kit Image Developer Concentrate al 0,02%, Background Reducer Concentrate al 0,005%. Tras retirar la solución de revelado se añadió una disolución compuesta por ácido acético glacial (Scharlan, España) al 5% durante 10 minutos para detener el proceso de tinción. Finalmente, tras retirar la solución de parada, se añadió agua Milli-Q durante 10 minutos.

4.4.2. Tinción con azul de Coomassie coloidal.

Este método de tinción se utilizó para teñir los geles preparativos. Todo el proceso de tinción se llevó a cabo bajo agitación moderada. Los geles se sumergieron durante toda la noche en una solución de composición 50% etanol absoluto y ácido fosfórico (Panreac, España) al 2%. Tras eliminar la disolución de fijación, se le añadió agua Milli-Q durante 10 minutos. Este paso se realizó por triplicado. A continuación, se añadió la solución de tinción durante 1 hora. La composición de dicha disolución fue sulfato amónico (Panreac, España) al 17%, ácido fosfórico al 3% y metanol (Fluka, España) al 32%. Transcurrida una hora se añadió, sin eliminar la solución anterior, 5 ml de una disolución de composición azul de Coomassie (Bio-Rad, EEUU) al 6,6% en metanol. El tiempo de incubación fue de 48 horas. Tras retirar la solución anterior se añadió agua Milli-Q durante 2 minutos.

4.5. Análisis de imagen.

Una vez teñidos los geles se escanearon en el densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EEUU) para posteriormente poder realizar el análisis de imagen empleando programa PD-Quest 8.0.1 de Bio-Rad. Este programa es capaz de determinar el número de proteínas detectadas en cada gel así como emparejar entre distintos geles las proteínas coincidentes. El método del programa es sumamente útil aunque se debe revisar manualmente, ya que en ocasiones identifica como proteínas manchas de exceso de tinción o realiza mal los emparejamientos entre los distintos geles.

Se seleccionaron las proteínas cuya densidad óptica variaba significativamente entre los distintos grupos. Para ello se empleó el test de la t de Student (95% de confianza). Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

4.6. Espectrometría de masas.

Para la identificación mediante espectrometría de masas se seleccionaron las proteínas que presentaban diferencias significativas al establecer comparaciones entre los distintos grupos de animales y que además el valor del ratio de las densidades ópticas de los grupos comparados debían ser mayor o igual a 1,5. Los puntos seleccionados, se recortaron del gel con ayuda de una punta de micropipeta y se llevaron a analizar

mediante espectrometría de masas a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. En dicha unidad el procedimiento seguido fue el siguiente:

Los puntos recortados se redujeron, alquilaron y digirieron con tripsina según el procedimiento de Shevchenko y colaboradores (1996). Parar ello, en primer lugar, los puntos del gel se lavaron dos veces con agua. A continuación, se deshidrataron durante 15 minutos con acetonitrilo al 100%. El disolvente se evaporó durante 30 minutos en Savant SpeedVac. Transcurrido ese tiempo, las muestras se redujeron incubándolas en una disolución 10 mM de DTT en amonio bicarbonato 25 mM durante 30 minutos a 56° C. Posteriormente, se llevó a acabo la alquilación, para lo cual las muestras se incubaron durante 15 minutos en oscuridad con una disolución de iodoacetamida 55 mM en amonio bicarbonato 25 mM. Para la digestión se usó una disolución de tripsina (Roche Molecular, España) de concentración 12,5 µg/µl en amonio bicarbonato 25 mM a pH 8,5 y se dejó incubar durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente 1 µl del sobrenadante recogido se depositó sobre una placa de MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0,4 µl de una disolución 3 mg/ml de ácido α-ciano-4-hidroxi-transcinámico (Sigma, España) en acetonitrilo al 50% y de nuevo se dejó secar a temperatura ambiente.

El espectrómetro de masas utilizado fue 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA), en modo reflector positivo con un voltaje ascendente de 20000 V. Todos los espectros se calibraron internamente usando péptidos de la auto-digestión con tripsina. El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF dio lugar a huellas peptídicas. Se elaboró una lista en la que se recogieron los pesos moleculares monoisotópicos de los péptidos que presentaban una relación de señal/ruido mayor de 20.

Las muestras en las que las proteínas no fueron identificadas por huella peptídica de forma concluyente o significativa estadísticamente ($p < 0.05$) fueron susceptibles de análisis de fragmentación de péptidos (MS/MS analisis) seleccionando del espectro MS aquellos precursores, generalmente 3 ó 4, con una S/N > 10 y sin otros péptidos próximos en una ventana de masa de +/- 10 Da. Para ello se utilizó el equipo 4700 Proteomics Analyzer. Los precursores seleccionados se fragmentaron utilizando un método de 1Kv reflector positivo. La calibración de la placa y la calibración por defecto se optimizaron para el procesamiento de los espectros de fragmentación ó MS/MS. Estos espectros MS/MS también se enfrentan a las fragmentaciones teóricas de los péptidos

trípticos anotados en las bases de datos y dan información no sólo de la coincidencia de la masa monoisotópica del péptido sino también de la coincidencia en su secuencia.

Para la identificación de proteínas se usaron las bases de datos de NCBI o SwissProt que utilizan el motor de búsqueda MASCOT 1.9 (matrixscience.com) a través de Global Protein Server v3.5 de Applied Biosystems. Las proteínas se identifican en base a las coincidencias si son estadísticamente significativas, es decir, que no se deben al azar utilizando el algoritmo de MASCOT. Los parámetros de búsqueda fueron:

- La carbamidometilación de la cisteína se consideró fija y la oxidación de la metionina variable.
- La tolerancia de la masa de los péptidos fue de 50-100 ppm.
- La tripsina sólo puede tener un sitio equivocado de corte.
- La tolerancia de la masa de los fragmentos fue de 0,3 Da.

Aceptamos como proteínas correctamente identificadas aquellas en las que la puntuación de Mowse era mayor que la puntuación fijada por MASCOT como significativa con un valor de p menor de 0,05. Además se comprobó que los parámetros teóricos de peso molecular y punto isoelectrico eran similares a los experimentales.

5. Análisis de la fosforilación de proteínas en el núcleo accumbens de animales con diferente vulnerabilidad a la adicción a morfina y cocaína.

Ante la imposibilidad de realizar este estudio con todos los grupos experimentales, y para los dos núcleos cerebrales (apartados 2 y 3.), se creyó conveniente llevarlo a cabo en el NAcc de los animales que habían sido sometidos al test de extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína y morfina. Por tanto, los grupos experimentales que se utilizaron en este punto, fueron los animales tanto que extinguieron la conducta de búsqueda (E) como los que la mantuvieron (NE), y a los cuales después de la fase de extinción se les administró salino (tabla 4).

Tabla 4: Grupos de animales utilizados para el análisis de fosforilación de proteínas en el NAcc

CPP	EXTINCIÓN	TRATAMIENTO POST-EXTINCIÓN	Grupo experimental	n
MORFINA	EXTINGUEN	SALINO	MOR-E SAL	6
	NO EXTINGUEN		MOR-NE SAL	6
COCAÍNA	EXTINGUEN	SALINO	COC-E SAL	6
	NO EXTINGUEN		COC-NE SAL	6

El análisis proteómico de dichas muestras se realizó en el departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Pompeu Fabra situada en el Parc de la Recerca Biomedica de Barcelona.

5.1. Extracción y purificación de las proteínas de la muestra.

Las proteínas utilizadas se extrajeron con el kit "Protein Extration Kit" como se describió en el apartado 4.1. Posteriormente, se realizó *pool* con las muestras de los núcleos accumbens de los 6 animales de los que se disponían por cada grupo experimental. Se procedió a purificar las proteínas con el kit 2-D Clean-Up Kit (Amersham Bioscience, EEUU). Las proteínas se resuspendieron en un volumen final de 450 µl en buffer de rehidratación cuya composición fue urea 8M, CHAPS al 2%, Anfolitos (Amersham Bioscience, EEUU) al 0,5%, DTT 40mM, trazas de azul de bromofenol y Destreak Reagent (Amersham Biosciences, EEUU) al 1,2%. A continuación se procedió a cuantificar la cantidad de proteína de la muestra mediante el kit 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences, EEUU).

5.2. Isoelectroenfoque (IEF): 1ª Dimensión.

Se cargaron 140 µg de la muestra en cada pocillo de la bandeja de hidratación; a continuación, cada muestra se cubrió con una tira IPG de 24 cm con un rango de pH de 3 a 11 no lineal (Amersham Biosciences, EEUU). Las muestras se sometieron a un proceso de hidratación pasiva durante 18 horas. Inmediatamente después, se colocaron las muestras en la fuente de isoelectroenfoque Ettan™ IPGphor (Amersham Biosciences, EEUU), se cubrieron con aceite mineral y se les aplicó voltaje hasta alcanzar un valor final de 38000 V/h.

Una vez realizado el isoelectroenfoque, antes de realizar la segunda dimensión, las tiras se equilibraron en dos pasos. En el primero de ellos las tiras se agitaron durante 15 minutos en 4 mL de una disolución que contenía urea 6M, SDS al 2 %, 50 mM Tris HCl pH 8,8, glicerol al 30% y DTT al 1 %. En el segundo paso las tiras se agitaron de nuevo durante 10 minutos en 4 mL de una solución idéntica a la del paso anterior salvo que el DTT se sustituyó por iodoacetamida al 4%.

5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE): 2ª Dimensión.

Para la segunda dimensión se emplearon geles de 240x205x1 mm que se prepararon en la cubeta DALT twelve Gel Caster (Amersham Biosciences, EEUU). La composición de los mismos fue: acrilamida/bisacrilamida al 12%, Tris HCl pH 8,8 0,5 M, Duracryl al 20%, SDS al 10%, tiosulfato de sodio al 0,08%, amonio persulfato al 0,1% y TEMED al 0,06%. Las tiras IPG se sellaron a la parte superior de los geles utilizando una solución de agarosa al 1% con trazas de azul de bromofenol.

Una vez solidificada la agarosa los cristales se colocaron en la cubeta "Ettan™ DALT twelve Large Vertical System" (Amersham Biosciences, EEUU). Esta cubeta permite realizar la electroforesis de 12 geles a la vez, lo cual disminuye la variabilidad entre geles que es debida a las diferentes condiciones de manipulación. La electroforesis se realizó en un amperaje constante de 5 mA por gel durante 14 horas.

5.4. Tinción de los geles para visualizar las proteínas fosforiladas.

Para visualizar las proteínas fosforiladas se utilizó un tipo de tinción fluorescente que se une al grupo fosfato unido a residuos de tirosina, serina o treonina. Los geles se sumergieron en una solución compuesta por metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 1 hora en agitación moderada. Tras retirar la solución de fijación se añadió agua Milli Q y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Este paso se realizó por triplicado. Después de eliminar el agua del último lavado, se añadió la solución de tinción Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen, EEUU) y se agitó durante 2 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo y tras eliminar la solución de tinción, se añadió una solución compuesta por acetonitrilo al 20% y acetato sódico 50 mM a pH 4,0, la cual reduce el exceso de fondo en los geles y la tinción de las señales inespecíficas. Los geles estuvieron en contacto con esta solución durante 30 minutos; este paso se realizó por

triplicado. Por último y tras retirar la solución anterior, los geles se lavaron con agua Milli Q durante 5 minutos por duplicado.

5.5. Análisis de imagen.

Los geles fueron escaneados usando un escáner Typhoon (Amersham Biosciences, EEUU). Las imágenes adquiridas se mandaron a Ludesi Analysis Center (Sweden, <http://www.ludesi.com>) para que se realizara el análisis de imagen de los geles obtenidos previamente. Los puntos de los geles fueron detectados automáticamente y los resultados se revisaron manualmente verificando o editando, si era necesario, los puntos obtenidos. Los puntos de los geles se emparejaron de forma automática usando un sistema de emparejamiento de todos los geles con todos los geles, evitando de esta manera la parcialidad que se produce cuando se usa un gel de referencia. Se midieron las intensidades integradas de cada punto, se corrigió el fondo y, a continuación, se normalizó la intensidad de los puntos matemáticamente reduciendo así la diferencia de la expresión media entre los puntos.

El análisis se llevó a cabo utilizando Ludesi REDFIN (Sweden, <http://www.ludesi.com>). Para ello, se utilizó el volumen normalizado de los puntos. Los criterios empleados para considerar que la expresión de las proteínas varió de forma importante fueron:

- a) Valor del ratio de las densidades ópticas de los grupos comparados debía ser igual o mayor a 2.
- b) El valor medio del volumen del punto fue mayor o igual de 300 ppm.
- c) Las proteínas debían estar presentes al menos en el 50% de los geles analizados.

Todos estos puntos se verificaron manualmente para asegurarse de que habían sido correctamente detectados, cuantificados y emparejados en todos los geles.

5.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Los puntos se recortaron de los geles con el sistema automático Spot Picker (Amersham Biosciences, EEUU) y se introdujeron en una placa de digestión de 96 pocillos Multiscreen Solvinert plate (Millipore, Irlanda). Los fragmentos de geles recortados se deshidrataron añadiendo a cada pocillo 200 μ l de una solución de acetonitrilo al 40% en NH_4CO_3 100 mM e incubándolos durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución anterior, se añadió a cada pocillo 200 μ l de

acetonitrilo y se incubó durante 10 minutos de nuevo a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró el acetonitrilo manteniendo el filtrado durante 5 minutos para asegurar que se había retirado completamente. Se añadieron 30 µl de tripsina (5 ng/µl) a cada uno de los pocillos procurando que la solución entrase completamente en contacto con el fragmento de gel recortado. Se incubó la placa durante 30 minutos a 4° C. A continuación se añadió en cada pocillo NH₄CO₃ 100 mM en cantidad suficiente para cubrir el fragmento de gel y se incubó durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se procedió a extraer los péptidos de los fragmentos de geles. Para ello a cada pocillo se añadió 300 µl de una solución de composición acetonitrilo al 40% y ácido fórmico al 5% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se filtró y colectó la solución con la extracción de los péptidos. A continuación, se añadió de nuevo un volumen de 150 µl de la solución acetonitrilo al 40% y ácido fórmico al 5% y se incubó durante una hora. El extracto de péptidos recolectado se mezcló con la fracción anteriormente obtenida y se evaporó el disolvente en SpeedVac, miVAC, DNA Concentrador (Barnstead Genevac, Inglaterra). Cuando se evaporó toda la disolución, los péptidos de cada pocillo se resuspendieron en 8 µl de buffer de composición acetonitrilo al 3% y ácido fórmico al 0,1% y se traspasaron a viales de nano LC.

Para el análisis mediante NanoLC-MS/MS, las muestras se analizaron en LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Alemania) acoplado a una fuente nano-ESI (Proxeon, EEUU) con un sistema de separación previa Agilent 1200 series. Los péptidos se separaron durante 25 minutos en columna C18 de fase reversa (preparada en el laboratorio), utilizando una solución de gradiente lineal de acetonitrilo del 3-45% en ácido fórmico al 0,1%. Los datos obtenidos se analizaron en un modo de adquisición de datos independiente.

Para la identificación de las muestras, los resultados de nanoLC-MS/MS se trataron con MASCOT (MatrixScience) v2.1 utilizando proteínas de la base de datos NCBI o SwissProt. Los parámetros de búsqueda fueron:

- La tripsina sólo puede tener un sitio equivocado de corte.
- La carbamidometilación de la cisteína se consideró fija y la oxidación y deamidación de la metionina variable.
- La tolerancia de la masa de los péptidos fue de 10 ppm.
- La tolerancia de la masa de los fragmentos fue de 0,5 Da.

La puntuación de las proteínas resultó de la puntuación de los iones como base no probabilística para establecer una lista de posibles proteínas identificadas con éxito. Esta puntuación de las proteínas fue la suma de la puntuación de los iones de todos los péptidos que no se encontraban por duplicado. El umbral de puntuación para lograr que el valor de p fuera menor de 0,05, se calculó mediante un algoritmo de Mascot y los péptidos se filtraron con un valor de corte de 0,1, lo que nos indica que este resultado se podría deber al azar si la base de datos utilizada fuese 10 veces mayor.

6. Confirmación mediante Western Blot de los datos obtenidos en los estudios de electroforesis bidimensional.

Tras los resultados obtenidos en los ensayos de electroforesis bidimensional se valoró la realización de experimentos de Western Blot. A la vista de los resultados obtenidos en los apartados 3.2.1. y 3.3.1 del apartado “Resultados y Discusión”, las proteínas elegidas para llevar a cabo la confirmación de dichos resultados mediante Western Blot fueron la peroxirredoxina-2 (PRDX-2) y la proteína relacionada con la dihidropirimidasa-2 (DRP-2). Un gran número de proteínas de la familia a la que pertenece la proteína PRDX-2 están reguladas por la acción de las drogas de abuso (Li y Wang, 2007, Tannu y col., 2007; Witzmann y col., 2003). Además, tanto la PRDX-2 mostrará diferencias significativas en su expresión en múltiples ensayos realizados en esta tesis, por lo que se creyó conveniente realizar un ensayo de Western Blot con esta proteína para validar los resultados obtenidos mediante electroforesis bidimensional. Por otro lado, la proteína DRP-2 está implicada en el proceso de crecimiento axonal (Cole y col., 2006). La variación en su expresión se encuentra ampliamente relacionada con procesos relacionados con el consumo de sustancias adictivas (Taylor y col., 2007; Faure y col., 2009; Kobeissy y col., 2010). Además en los resultados de esta Tesis se ha observado que su expresión también varía en varios de los ensayos realizados, por lo que se consideró una proteína de interés para confirmar los resultados obtenidos mediante Western Blot.

Las proteínas extraídas en el apartado 4.1. se desnaturalizaron con una solución compuesta por: Tris 0,5M pH 6,8; glicerol al 10%; SDS al 2%; β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,1% (Laemmli, 1970), calentándose en un baño a 100° C durante 5 minutos. Después, 10 μ L de cada muestra se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% en tampón electrodo (glicina 0,2M, tris 0,025M y SDS al 0,1%) y se aplicó un voltaje de 200V durante 45 minutos. De esta manera, mediante

electroforesis en condiciones desnaturizantes, las proteínas quedaron separadas en función de su peso molecular.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a membranas de PVDF (Amersham Biosciences, EEUU). Para ello se aplicó un amperaje constante de 400 mA durante una hora en tampón de transferencia (glicina 0,2 M, Tris 0,025M, SDS al 0,1% y metanol al 20%). Las membranas se lavaron varias veces con una solución de leche en polvo sin grasa al 0,1% en PBS-T (tampón fosfato salino con Tween 20 al 0,05%) y se bloquearon durante una hora con una solución de leche en polvo sin grasa al 5% en PBS-T para evitar las uniones inespecíficas. Tras varios lavados, las membranas se incubaron toda la noche en agitación a 4° C con el anticuerpo primario de la proteína correspondiente (tabla 5) diluido en una solución de albúmina al 0,5% en PBS-T. Tras varios lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa diluido en una solución de leche desnatada al 1% en PBS-T, durante una hora a temperatura ambiente.

Tabla 5: Anticuerpos y diluciones utilizadas en los ensayos de Western Blot para la confirmación de los resultados obtenidos en electroforesis bidimensional

PROTEÍNA	Ac 1 ^o	DILUCIÓN	Ac 2 ^o	DILUCIÓN
DRP-2	Anti-DRP2 producido en conejo (Sigma-Aldrich, Alemania)	1:10000	Anti-conejo producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, EEUU)	1:5000
PRD-2	Anti-PRDX2 producido en conejo (Sigma Aldrich, Alemania)	1:2000	Anti-conejo producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, EEUU)	1:5000

Tras el lavado de las membranas, las bandas correspondientes a la proteína, se detectaron mediante la luz emitida por la oxidación del luminol en presencia del enzima peroxidasa (ECL), (Amersham Biosciences, EEUU), exponiendo las membranas durante 2 minutos a una película Hyperfilm-ECL (Amersham Biosciences, EEUU) y revelando con líquidos reveladores y fijadores (Kodak). Finalmente, las bandas se densitometraron en el densitómetro GS-800 empleando el programa informático Quantity One (Bio Rad, EEUU).

Como control de carga se utilizó la proteína β -actina, utilizando como anticuerpo primario (anit- β -actina producido en ratón, 1:1000, Sigma-Aldrich, España) y como anticuerpo secundario (anti-mousse producido en oveja, 1:5000 para β -Actina, Amersham

Bioscience, EEUU). Por ello, la densidad óptica de las bandas de la proteína en estudio se dividieron por la densidad óptica de las bandas correspondiente de β -actina.

7. Análisis estadístico.

7.1. Análisis de los datos de los ensayos de condicionamiento preferencial al sitio.

Los datos obtenidos en los ensayos de condicionamiento preferencial al sitio (CPP) y de los tests de extinción, se compararon empleando el análisis de la varianza de una vía (1W-ANOVA), seguido del test de Newman Keuls para comparaciones múltiples. Se consideraron grupos significativamente distintos desde el punto de vista estadístico cuando $p < 0,05$.

7.2. Análisis de los datos de proteómica.

Para la obtención de información sobre las diferencias en la expresión proteica en los distintos grupos experimentales, se establecieron las siguientes comparaciones:

a) F SAL vs L SAL; E SAL VS NE SAL: En estas comparaciones se estudian las diferencias en la expresión proteica a nivel basal en animales que muestran distinta vulnerabilidad a los efectos adictivos de cocaína o morfina.

b) F COC vs L COC; F MOR vs L MOR; E COC vs NE COC; E MOR vs NE MOR: Estas comparaciones permiten el estudio de las diferencias en la expresión proteica derivadas de la administración aguda de cocaína o morfina en animales con distinta vulnerabilidad a los efectos de dichas drogas.

c) F SAL vs F COC; L SAL vs L COC; F SAL vs F MOR; L SAL vs L MOR: Estas comparaciones se establecieron con el fin de observar los cambios en la expresión proteica inducidos por la administración aguda de cocaína o morfina.

Las comparaciones de los apartados a) y b) permiten caracterizar perfiles de expresión proteica que podrían funcionar como marcadores directos de vulnerabilidad, bien previos al consumo de la droga o bien posteriores al mismo. Por este motivo, cuando se discuten los resultados se comentan con mayor detalle.

Para el análisis estadístico de la densidad óptica de las proteínas separadas por electroforesis bidimensional se empleó el test de la t de Student (95% de confianza). Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Las densidades ópticas obtenidas en los ensayos de Western Blot se compararon mediante el test de ANOVA, seguido del test de Newman Keuls para comparaciones múltiples. Se consideraron que las diferencias en la expresión de las proteínas eran significativas cuando $p < 0,05$.

Las proteínas identificadas en los diferentes estudios se agruparon en procesos biológicos mediante el empleo del software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity® Systems). Este software emplea el test de Fisher para calcular un valor de p que determine la probabilidad de que la asociación de un conjunto de proteínas con un proceso biológico sea debido al azar. Valores de p menores a 0,05 indican que dicha asociación no es debida al azar.

Este software también se utilizó para generar redes de conexiones entre las proteínas identificadas en cada análisis. En este tipo de representaciones, las moléculas se representan como nodos y la relación biológica entre ellos se refleja con líneas. Todas las conexiones entre moléculas están avaladas por al menos una referencia recogida en la literatura, en libros o en la información registrada en la Base de Conocimiento de Ingenuity Pathways.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por drogas.

La amplia experiencia de nuestro grupo en el método de condicionamiento al sitio (ver p.e. Morales y col., 2000; Morales y col., 2007) nos permitió plantearnos la posibilidad de que este ensayo constituyese la herramienta principal para la obtención de animales que se distinguieran por su velocidad de extinguir el comportamiento de búsqueda, lo cual es fiel reflejo de la vulnerabilidad individual al consumo de la droga utilizada en cada ensayo.

Debido a que en la bibliografía no existían datos experimentales donde basarnos para desarrollar una metodología de extinción que permitiera separar claramente a cada grupo de tratamiento en dos subpoblaciones: una que mantuviera la preferencia al sitio y otra que la extinguiera; se decidió llevar a cabo el siguiente protocolo.

1.1. Establecimiento del protocolo de extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína.

Una vez finalizado el test de condicionamiento al sitio con cocaína 15 mg/Kg (ver material y métodos apartado 3.1), los animales seleccionados fueron alojados nuevamente en sus jaulas, sin tener acceso al laberinto, durante los días 6 y 7 de ensayo (fase de extinción pasiva). Posteriormente, a los animales cada día se les permitió circular libremente por el laberinto registrándose y analizando los tiempos de permanencia en cada compartimento.

Los resultados obtenidos, revelaron que en el día 10 los animales se habían diferenciado claramente en dos subpoblaciones: una que *Extinguía (E)* y otra que *No Extinguía (NE)* el comportamiento de preferencia inducido por cocaína, con unos porcentajes cercanos al 50% de representación en cada grupo. Dichas condiciones se reprodujeron en los ensayos posteriores de condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína. Por lo tanto, se fijó este día 10, para los posteriores estudios. La tabla 6 y la figura 13 muestran los tiempos de estancia en el compartimento asociado a la cocaína de los animales sometidos a dicho ensayo.

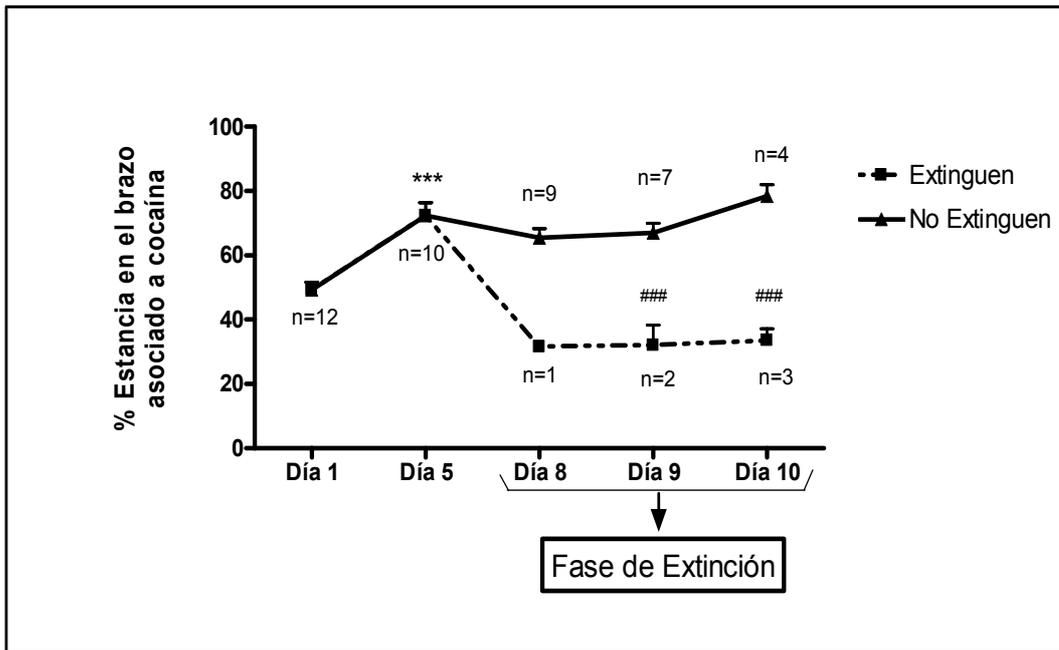


Figura 13: Porcentaje de estancia en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína. (***) $p < 0,001$ respecto al porcentaje de estancia de los animales en la fase de preconditionamiento). (###) $p < 0,001$ respecto al porcentaje de estancia de los animales que mantuvieron la conducta de búsqueda).

Hay que señalar, que en los ensayos posteriores, los animales condicionados con cocaína se mantuvieron en sus jaulas hasta el día 10 (fase pasiva de extinción), día en el que se les permitió de nuevo circular a los animales libremente por el laberinto. En ningún, caso, los resultados obtenidos variaron significativamente respecto a los mostrados en el apartado anterior. Lo que implica, que al menos en nuestras condiciones experimentales, no parece influir que la fase de extinción pasiva dure 2 días o como en el caso de los ensayos que se muestran a continuación duren 4 días.

Tabla 6: Tiempo de estancia (s) de los animales en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por cocaína. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de permanencia en valores absolutos de los animales en el brazo asociado a la cocaína. (***) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales en la fase de precondicionamiento). (###) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales que mantuvieron la conducta de búsqueda).

FASES DEL CONDICIONAMIENTO (CPP)		FASES DE EXTINCIÓN					
Precondicionamiento (Día 1) n=12	Libre elección (Día 5) n=10	Extinguen (Día 8) n=1	No Extinguen (Día 8) n=9	Extinguen (Día 9) n=2	No Extinguen (Día 9) n=7	Extinguen (Día 10) n=3	No Extinguen (Día 10) n=4
886,8 \pm 42,1	1302,3 \pm 73,1***	569,2	1178,9 \pm 50,7	575,9 \pm 113,8###	1206,1 \pm 53,7	604,4 \pm 65,0###	1412,9 \pm 64,0

1.2. Establecimiento del protocolo de extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por morfina.

Al igual que en el caso de los ensayos de condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína, fue necesario establecer un protocolo para diferenciar poblaciones de animales que difirieran en la velocidad de extinción del comportamiento de búsqueda inducido por morfina. Para ello se realizó un ensayo de condicionamiento preferencial al sitio inducido por dicha droga a la dosis de 10 mg/kg (ver material y métodos apartado 3.2.) Una vez finalizado el test de condicionamiento, los animales seleccionados fueron alojados nuevamente en sus jaulas, sin tener acceso al laberinto, durante los días 6 y 7 de ensayo (fase de extinción pasiva). En el día 8, a las ratas se les permitió circular libremente por el laberinto evaluándose los tiempos de estancia en los compartimentos.

Se eligió este día 8 para los ensayos posteriores ya que en ese día los animales se habían diferenciado claramente en dos grupos: *Extinguían (E)* y *No Extinguían (NE)* el comportamiento de preferencia inducido por morfina, con unos porcentajes aproximados al 50% del total de los animales que entraban en el estudio, resultado que se reprodujo básicamente en los siguientes estudios. La tabla 7 y la figura 14 muestran los tiempos de estancia en el compartimento asociado a la morfina de los animales sometidos a este ensayo.

Tabla 7: Tiempo de estancia (s) de los animales en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por morfina. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de permanencia en valores absolutos de los animales en el brazo asociado a la morfina. (***) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales en la fase de precondicionamiento). (###) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales que mantuvieron la conducta de búsqueda).

FASES DEL CONDICIONAMIENTO (CPP)		FASES DE EXTINCIÓN	
Precondicionamiento (Día 1) n=18	Libre elección (Día 5) n=16	Extinguen (Día 8) n=9	No Extinguen (Día 8) n=7
885,6 \pm 20,73	1325,0 \pm 42,40***	918,7 \pm 31,75###	1250,0 \pm 56,08

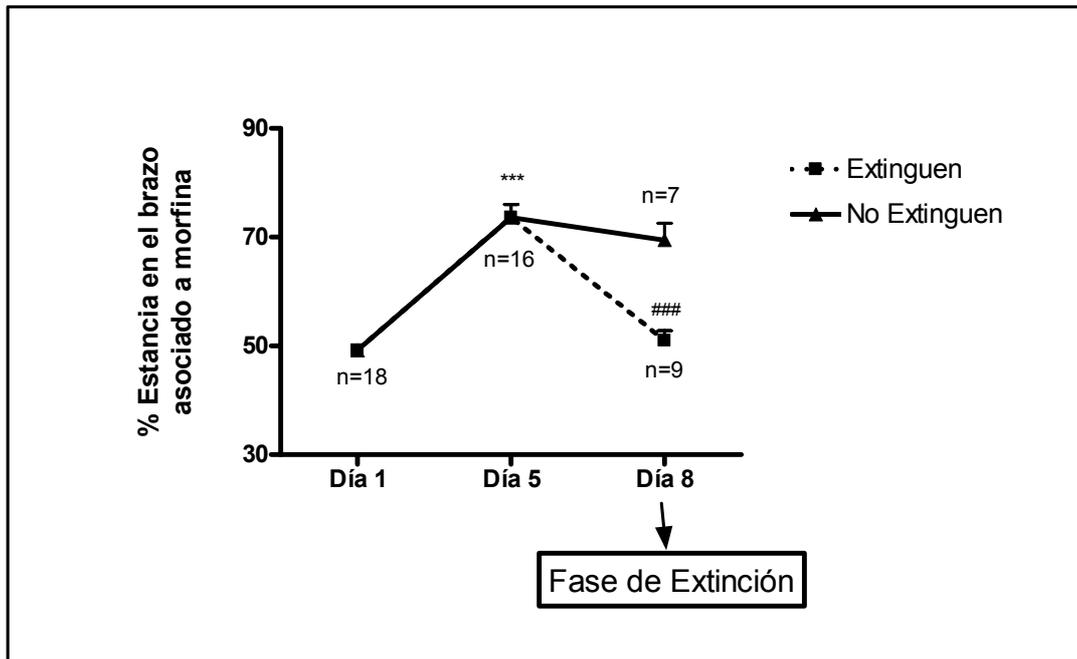


Figura 14: Porcentaje de estancia en el brazo asociado a la droga en los estudios preliminares de la extinción del comportamiento de preferencia al sitio inducido por morfina. (***) $p < 0,001$ respecto al porcentaje de estancia de los animales en la fase de preconditionamiento). (###) $p < 0,001$ respecto al porcentaje de estancia de los animales que mantuvieron la conducta de búsqueda).

2. Extinción de la preferencia al sitio inducida por drogas.

2.1. Extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.

Establecidas ya nuestras condiciones experimentales, según se ha mostrado en el apartado 1.1., se procedió a extinguir el condicionamiento al sitio inducido por cocaína. Para ello, con los animales que no mostraron ni preferencia ni aversión basal por alguno de los compartimentos en la fase de precondicionamiento, se llevo a cabo el protocolo de condicionamiento (días 2, 3 y 4), libre elección (día 5), y test de extinción de la preferencia condicionada (día 10).

En el día de libre elección, todos los grupos experimentales exhibieron una estancia significativamente superior en el brazo asociado al tratamiento con cocaína con respecto al precondicionamiento (Figura 15); lo que indica una preferencia por el sitio asociado al tratamiento con cocaína 15 mg/Kg.

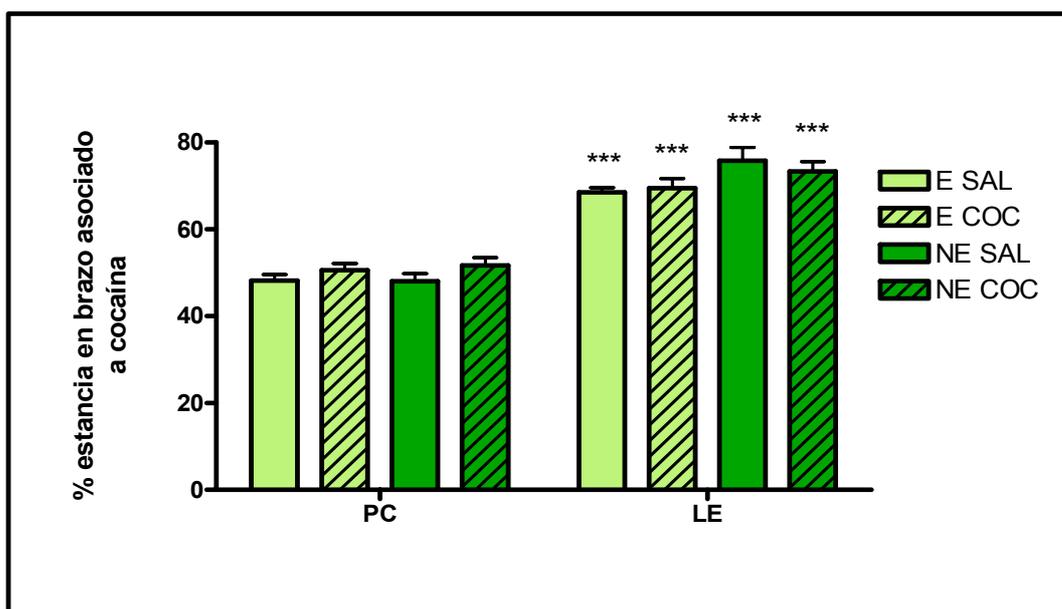


Figura 15: Test de condicionamiento al sitio inducido por cocaína 15 mg/kg. Las barras representan la media \pm E.S.M. del porcentaje de estancia en el brazo asociado a la droga. PC: Precondicionamiento, LE: Libre Elección. (***) $p < 0,001$ respecto al porcentaje de estancia de los animales en la fase de precondicionamiento). Grupo E SAL $n=13$; Grupo E COC $n=14$; Grupo NE SAL $n=11$; Grupo NE COC $n=12$.

Con los animales anteriormente seleccionados, se realizó el test de extinción, con el que se obtuvieron dos poblaciones de individuos, las cuales se distinguían por su velocidad en extinguir el comportamiento de búsqueda. De tal manera, el 52% de los

animales que habían mostrado preferencia al brazo asociado a la cocaína en dicho experimento, extinguieron la preferencia al sitio.

Tabla 8: Tiempo de estancia (s) de los animales en el brazo asociado a la cocaína en la extinción del condicionamiento al sitio de los grupos de tratamiento: Extingue + Salino (E SAL), Extingue + Cocaína (E COC), No Extingue + Salino (NE SAL) y No extingue + Cocaína (NE COC). Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de permanencia en valores absolutos de los animales en el brazo asociado a la cocaína en cada una de las fases del ensayo: PC: Precondicionamiento; LE: Libre Elección; EX: Test de extinción. (**p < 0,001 respecto al tiempo de estancia de los animales tratados con suero fisiológico en la fase de extinción que no mantuvieron la conducta adictiva). (###p < 0,001 respecto al tiempo de estancia en el test de extinción de los animales tratados con cocaína que no mantuvieron su conducta adictiva).

FASES DE ENSAYO	GRUPO DE TRATAMIENTO			
	E SF (n=13)	E COC (n=14)	NE SAL (n=11)	NE COC (n=12)
PC	879,4 \pm 35,2	902,0 \pm 35,9	871,5 \pm 38,2	996,4 \pm 22,0
LE	1251,9 \pm 38,7	1255,2 \pm 49,3	1314,2 \pm 85,9	1331,4 \pm 72,9
EX	925,8 \pm 31,4	828,2 \pm 110,6	1250,4 \pm 32,1***	1292,2 \pm 30,0###

Como se muestra en la figura 16, los animales que no extinguían la preferencia al sitio en el brazo asociado a cocaína en el test de extinción mantuvieron tiempos de estancias semejantes al que mostraban en la fase de libre elección, por el contrario las ratas que sí extinguieron dicha conducta, mostraron tiempos de permanencia en el brazo asociado a cocaína semejantes a los de la fase de precondicionamiento (basal). Esto implicó que se obtuvieran diferencias significativas entre los grupos correspondientes que extinguían o no la preferencia al lugar.

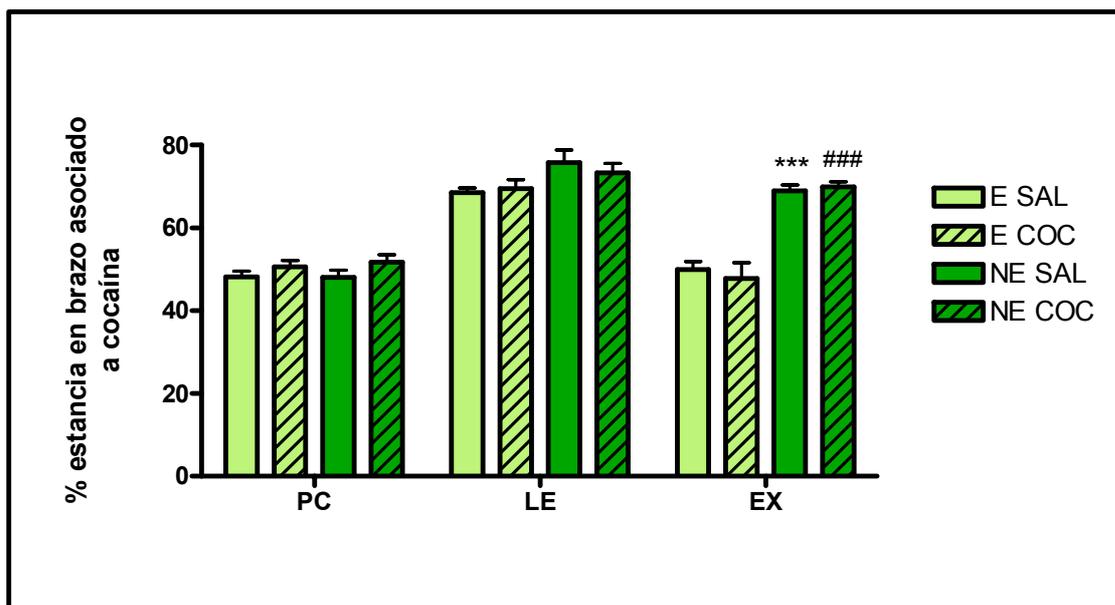


Figura 16: Extinción del comportamiento al sitio inducido por cocaína. Las barras representan la media + E.S.M. del porcentaje de estancia de los animales en el brazo asociado a la administración de cocaína en cada una de las fases del ensayo: PC: Precondicionamiento; LE: Libre Elección; EX: Test de extinción. (***) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales tratados con suero fisiológico en el test de extinción que no mantuvieron la conducta adictiva). (###) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia en el test de extinción de los animales tratados con cocaína que no mantuvieron su conducta adictiva). Grupo E SAL $n=13$; Grupo E COC $n=14$; Grupo NE SAL $n=11$; Grupo NE COC $n=12$.

2.2. Extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.

Establecidas ya nuestras condiciones experimentales, según se ha mostrado en el apartado 1.2., se procedió a extinguir el condicionamiento al sitio inducido por morfina. Para ello, con los animales que no mostraron ni preferencia ni aversión basal por alguno de los compartimentos en la fase de precondicionamiento, se llevo a cabo el protocolo de condicionamiento (días 2, 3 y 4), libre elección (día 5), y test de extinción de la preferencia condicionada (día 8).

En la fase de libre elección, todos los grupos experimentales mostraron valores del tiempo de estancia en el brazo asociado a la morfina significativamente mayores que en la fase de precondicionamiento (Figura 17). Estos valores reflejan una preferencia al sitio inducida por el tratamiento con morfina a la dosis de 10 mg/kg.

Como se indica en la sección de material y métodos (apartado 3.2.), los animales obtenidos en el ensayo de condicionamiento preferencial al sitio se utilizaron para realizar el test de extinción (día 8) que permitió separar los animales en dos

subpoblaciones atendiendo a su capacidad de extinguir o no su conducta de búsqueda hacia la morfina. De esta manera, el 50% de los animales que se utilizaron en este experimento extinguieron la preferencia al sitio.

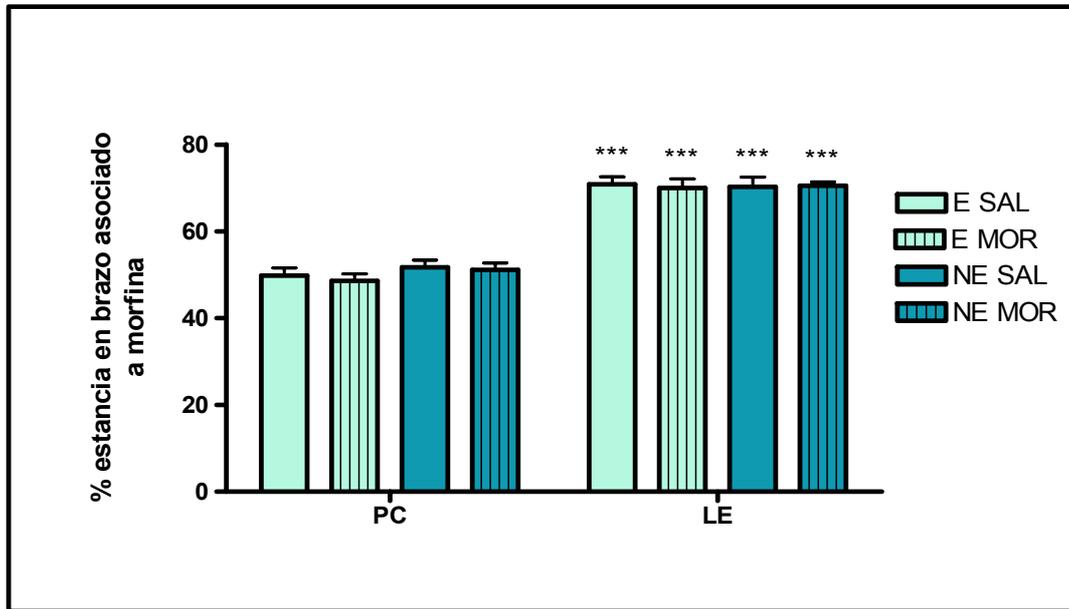


Figura 17: Test de condicionamiento al sitio inducido por morfina 10 mg/Kg. Las barras representan la media \pm E.S.M. del porcentaje de estancia en el brazo asociado a la droga. PC: Precondicionamiento, LE: Libre Elección. (***) $p < 0,001$ respecto al porcentaje de estancia de los animales en la fase de precondicionamiento). Grupo E SAL n=12; Grupo E MOR n=13; Grupo NE SAL n=11; Grupo NE MOR n=14.

Como se muestra en la tabla 9 y figura 18, los animales que extinguieron la preferencia al sitio en el brazo asociado a la morfina presentan en el test de extinción valores similares a los del precondicionamiento (basal) en el brazo asociado a la droga, mientras que los animales que no extinguieron dicha preferencia, en el test de extinción mostraron valores similares a los de la fase de libre elección. Así pues, los grupos que extinguieron la preferencia al sitio mostraron diferencias significativas en el test de extinción respecto a los grupos que no habían extinguido dicha conducta.

Tabla 9: Tiempo de estancia (s) de los animales en el brazo asociado a la morfina en la extinción del condicionamiento al sitio de los grupos de tratamiento: Extingue + Salino (E SAL), Extingue + Morfina (E MOR), No Extingue + Salino (NE SAL) y No Extingue + Morfina (NE MOR). Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de permanencia en valores absolutos de los animales en el brazo asociado a la morfina en cada una de las fases del ensayo: PC: Precondicionamiento; LE: Libre Elección; EX: Test de extinción. (***) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales tratados con salino en el test de extinción que no mantuvieron la conducta adictiva). (###) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia en el test de extinción de los animales tratados con morfina que no mantuvieron su conducta adictiva).

FASES DEL ENSAYO	GRUPO DE TRATAMIENTO			
	E SAL (n=12)	E MOR (n=13)	NE SAL (n=11)	NE MOR (n=14)
PC	895,9 \pm 31,3	874,0 \pm 29,8	931,4 \pm 29,1	919,9 \pm 29,1
LE	1274,5 \pm 32,1	1260,5 \pm 36,7	1264,2 \pm 41,1	1268,4 \pm 17,0
EX	906,6 \pm 39,8	890,2 \pm 43,6	1264,1 \pm 43,7 ^{***}	1208,1 \pm 17,8 ^{###}

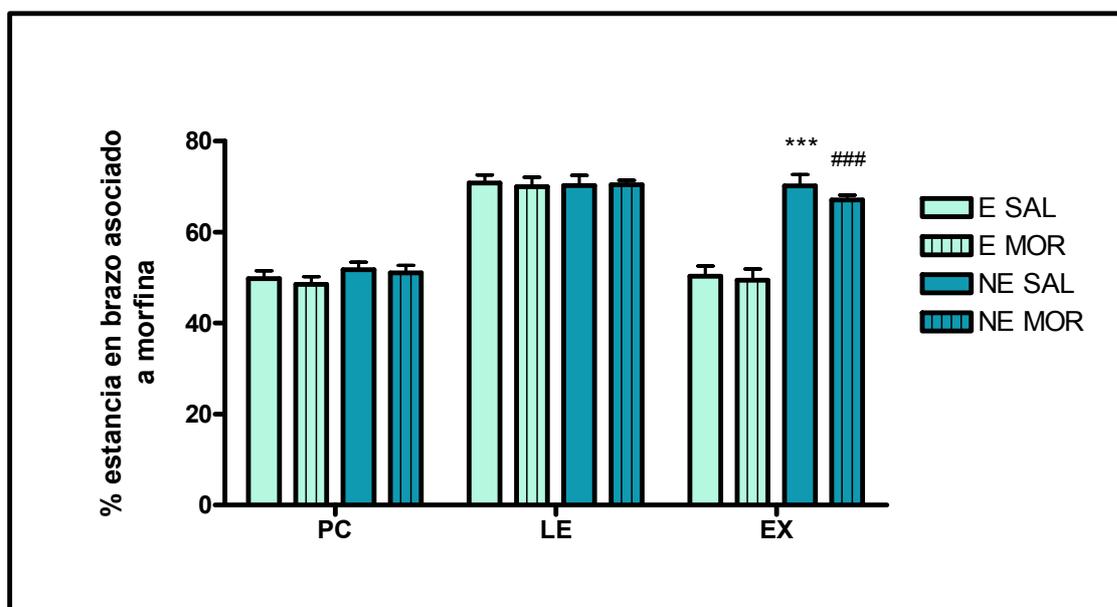


Figura 18: Extinción del comportamiento al sitio inducido por morfina. Las barras representan la media \pm E.S.M. del porcentaje de estancia de los animales en el brazo asociado a la administración de morfina en cada una de las fases del ensayo: PC: Precondicionamiento; LE: Libre Elección; EX: Test de extinción. (***) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia de los animales tratados con suero fisiológico en el test de extinción que no mantuvieron la conducta adictiva). (###) $p < 0,001$ respecto al tiempo de estancia en el test de extinción de los animales tratados con morfina que no mantuvieron su conducta adictiva). Grupo E SAL n=12; Grupo E MOR n=13; Grupo NE SAL n=11; Grupo NE MOR n=14.

El test de condicionamiento espacial, constituye un ensayo ampliamente utilizado para valorar las propiedades adictivas de las drogas, de tal modo que las sustancias que se comportan como drogas de abuso en humanos producen preferencia al sitio en animales de experimentación (Ambrosio y col., 1995; Bardo y col., 1995). En nuestro trabajo, el objetivo de estos ensayos de comportamiento, fue distinguir poblaciones de animales que mostraran diferencias en la vulnerabilidad al consumo tanto de cocaína como de morfina.

Como ya se comentó en la introducción de esta memoria, existe mucha variabilidad en los protocolos de condicionamiento, y básicamente hay que ajustar las condiciones experimentales a cada laboratorio, condición que se repite en los protocolos de extinción. En la bibliografía se han descrito básicamente dos maneras de extinguir el condicionamiento, bien administrando suero en el brazo asociado a la droga durante varios días (este es el caso de Muller y Stewart, 2000), bien dejando a los animales libres de drogas circular por el recinto (Szumlinski y col., 2002), protocolo, este último, que se asemeja al utilizado por nuestro grupo.

Hay que señalar que hasta la realización de nuestros estudios los trabajos de la extinción del comportamiento de búsqueda existentes en la bibliografía, nunca se habían dirigido a dividir a los animales en dos subpoblaciones claramente diferenciadas por su vulnerabilidad a los efectos de las drogas, sino a abolir completamente la preferencia al sitio. Esto nos obligó a poner a punto el protocolo para esta memoria. Como se ha visto en los resultados, para el caso de la cocaína los animales se tuvieron que dejar hasta el día 10 del ensayo, día donde se realizó una nueva prueba de libre elección, mientras que para el caso de la morfina tan solo hubo que esperar hasta el día 8, para obtener dichas subpoblaciones. Además, es importante volver a mencionar que los resultados obtenidos en los ensayos de la puesta a punto del protocolo, se reprodujeron con bastante fidelidad en todos los realizados con posterioridad. Por lo que, a nuestro entender, esta técnica se comporta como una importante herramienta experimental que permite separar individuos que, bajo las mismas condiciones ambientales, muestran diferencias en la respuesta a los efectos placenteros de las drogas de abuso.

Respecto a los resultados obtenidos de preferencia asociado al compartimento donde se administró la cocaína o la morfina, están en concordancia con los obtenidos por numerosos autores (Shippenberg y Heidbreder, 1995; Busse y col. 2004). Demostrando así, la validez de nuestros experimentos.

3. Análisis proteómico

3.1. Análisis proteómico de núcleos cerebrales de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.

Tras la extracción de los núcleos cerebrales de interés (NAcc y CPF) de los animales que se habían seleccionado en los ensayos de comportamiento con cocaína, se procedió al análisis proteómico de dichos núcleos mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas.

Como se ha comentado en el capítulo “Material y Métodos” los grupos experimentales y las comparaciones establecidas fueron las siguientes:

a) E SAL vs NE SAL: Esta comparación permite estudiar las diferencias en la expresión proteica a nivel basal en animales que muestran distinta vulnerabilidad a los efectos adictivos de la cocaína.

b) E COC vs NE COC: Esta comparación permite el estudio de las diferencias en la expresión proteica derivadas de la administración aguda de cocaína en animales con distinta vulnerabilidad a los efectos de dicha droga.

c) E SAL vs E COC; NE SAL vs NE COC: Estas comparaciones se establecieron con el fin de observar los cambios en la expresión proteica inducidos por la administración aguda de cocaína.

Las comparaciones de los apartados a) y b) permiten caracterizar perfiles de expresión proteica que podrían funcionar como marcadores directos de vulnerabilidad, bien previos al consumo de la droga o bien posteriores al mismo. Por ello, los resultados obtenidos de dichas comparaciones se discutirán con más detalle.

3.1.1. Análisis proteómico del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.

Después de la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional y tras su tinción con nitrato de plata se obtuvieron geles en los que se pueden observar una serie de puntos que corresponden al mapa proteico del NAcc de los animales

seleccionados (ver un ejemplo en la figura 19). Para la detección, emparejamiento y análisis de la densidad óptica de los puntos se utilizó el programa PD-Quest 8.0.1. La tabla 10 muestra para grupo experimental la media del número de puntos detectados.

Tabla 10: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles del NAcc de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína. E SAL: Extingue + Salino; E COC: Extingue + Cocaína; NE SAL: No Extingue + Salino; NE COC: No Extingue + Cocaína. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M.

GRUPO	n	Puntos detectados
E SAL	5	1006,0 \pm 150,1
E COC	5	881,2 \pm 148,4
NE SAL	5	978,8 \pm 181,6
NE COC	5	953,4 \pm 89,51

En la tabla 11 se muestran todas las proteínas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 11: Proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de la densidad óptica (D.O.) normalizada de cada proteína. E SAL: grupo Extingue + Salino; E COC: grupo Extingue + Cocaína; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE COC: grupo No Extingue + Cocaína. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL (n= 5).

CPP COCAÍNA-NAcc				
D.O. Normalizada				
Nº Punto	E SAL	E COC	NE SAL	NE COC
N-0001	4,55 \pm 1,30	3,34 \pm 1,46	9,58 \pm 1,09*	2,46 \pm 1,18 [#]
N-0002	5,95 \pm 1,34	6,82 \pm 1,51	11,46 \pm 1,13	7,98 \pm 0,78
N-0003	4,49 \pm 0,55	2,41 \pm 0,27 [#]	2,44 \pm 0,66*	2,60 \pm 0,24
N-0004	26,84 \pm 1,44	31,70 \pm 3,06	20,12 \pm 2,30*	19,99 \pm 1,99*
N-0005	6,00 \pm 1,15	3,41 \pm 0,60	3,40 \pm 0,37*	3,21 \pm 0,73
N-0006	1,60 \pm 1,07	16,32 \pm 2,35 [#]	7,76 \pm 3,08	24,61 \pm 2,78 ^{*#}
N-0007	3,51 \pm 1,73	9,65 \pm 1,74 [#]	5,35 \pm 2,29	3,34 \pm 1,05*
N-0008	19,79 \pm 1,52	21,46 \pm 0,90	20,32 \pm 1,38	17,73 \pm 1,05*
N-0009	7,97 \pm 1,19	8,04 \pm 0,60	9,71 \pm 1,09	4,94 \pm 1,23 ^{*#}
N-0010	42,83 \pm 2,57	29,71 \pm 3,97 [#]	38,18 \pm 1,59	38,23 \pm 4,91
N-0011	5,37 \pm 0,76	3,04 \pm 0,43 [#]	3,23 \pm 0,89	3,78 \pm 0,64
N-0012	17,91 \pm 2,00	12,28 \pm 0,95 [#]	13,87 \pm 2,25	11,76 \pm 2,55
N-0013	24,99 \pm 5,11	10,31 \pm 1,80 [#]	0,08 \pm 0,01	9,00 \pm 3,71
N-0014	14,07 \pm 4,18	13,50 \pm 1,94	20,01 \pm 2,95	10,29 \pm 1,33 [#]
N-0015	6,02 \pm 0,76	5,35 \pm 0,76	7,30 \pm 1,22	4,56 \pm 0,32 [#]
N-0016	14,93 \pm 2,24	10,23 \pm 1,86	18,24 \pm 2,36	8,52 \pm 2,51 [#]
N-0017	15,43 \pm 3,07	14,35 \pm 1,68	21,86 \pm 2,78	10,43 \pm 2,88 [#]
N-0018	4,53 \pm 0,67	4,11 \pm 0,39	5,34 \pm 0,48	3,49 \pm 0,60 [#]
N-0019	8,81 \pm 2,93	12,65 \pm 1,24	19,39 \pm 3,62	9,86 \pm 1,53 [#]

En la figura 19 se muestra un gel representativo de las proteínas extraídas de NAcc. En dicho gel se han marcado las proteínas que mostraron diferencias significativas en las comparaciones anteriormente detalladas.

De entre todas las proteínas cuya densidad óptica varió significativamente, se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 14 proteínas. Dichas proteínas se han señalado en color verde en el gel de la figura 19. Los datos de espectrometría de masas que sirvieron para la identificación de dichas proteínas se muestran en la tabla 12. En la figura 20 se representa gráficamente la densidad óptica de las proteínas identificadas.

A modo de resumen, en la tabla 13 se recogen las proteínas identificadas, indicando las comparaciones en las que mostraron diferencias significativas y, en esos casos, el ratio de variación.

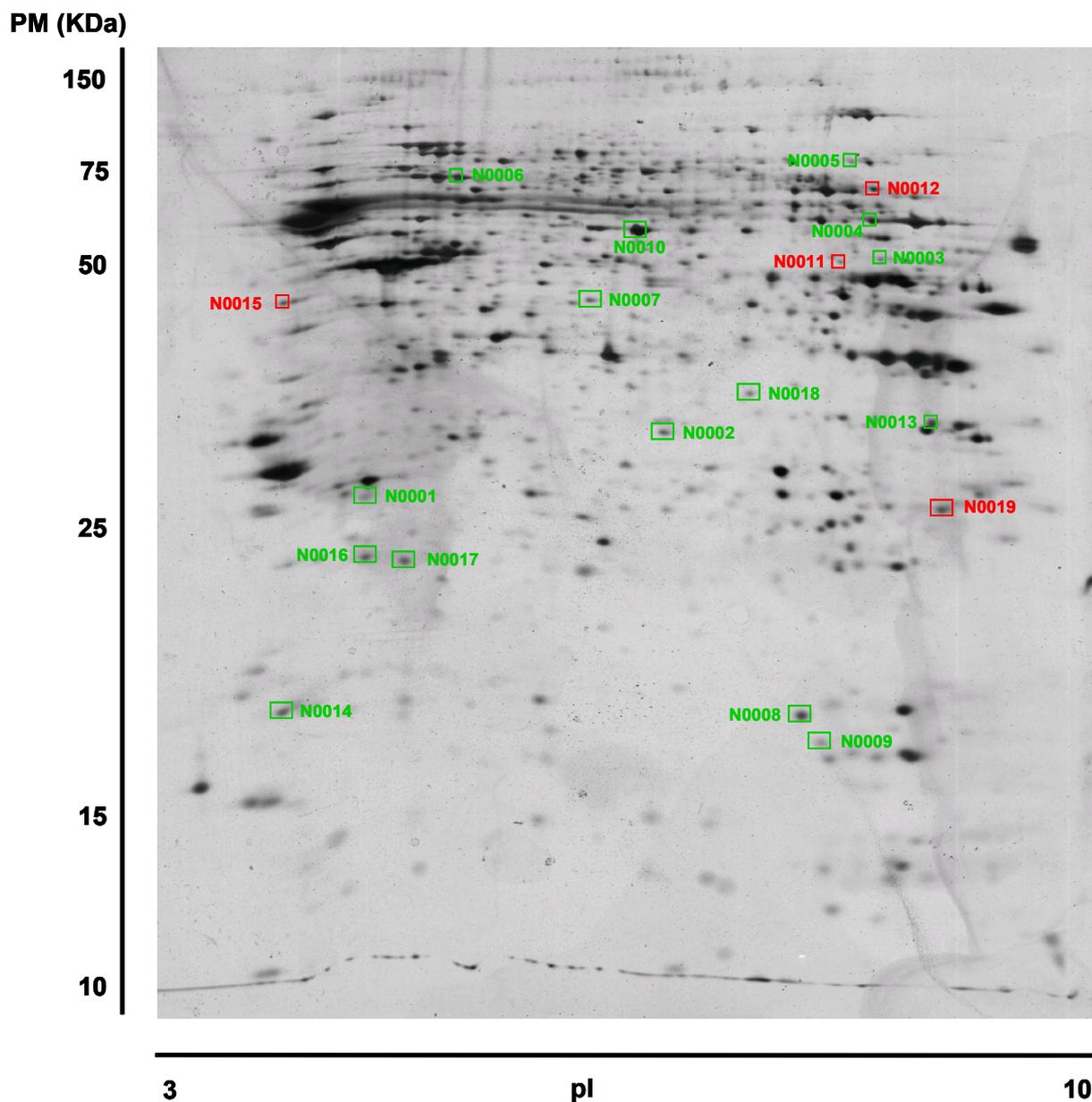


Figura 19: Gel bidimensional representativo de las proteínas de NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína. Las proteínas marcadas mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos y las señaladas en color verde se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 12: Proteínas identificadas por espectrometría de masas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína. PM: Peso molecular; pl: Punto isoeléctrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot. *Código de las proteínas tomado de la base de datos del NCBI

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína*	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados	Secuencia MS/MS
N-0001	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2	P19234	27703	6,23	70	38	10	
N-0002	Glutation transferasa ω -1	Q9Z339	42403	7,17	66	18	4	
N-0003	Fumarasa	P14408	53152	8,48	33	3	1	IYELAAGGTAVGTGLNTR
N-0004	ATP-sintasa subunidad α	P15999	59831	9,22	248	51	31	
N-0005	Transquetolasa	P50137	68342	7,23	130	31	17	
N-0006	Proteína de choque térmico de 60 KDa	P63039	61088	5,91	111	36	15	
N-0007	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] 1- α	Q561S0	40753	7,64	138	37	3	VTSAYLQDIEDAYKK KLHEYSR LQSWLYASR
N-0008	Nucleósido Difosfatasa Quinasa B	P19804	17386	6,92	132	71	12	
N-0009	Peroxirredoxina-5	Q9R063	22504	8,94	71	33	7	
N-0010	Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2 (DRP-2)	P47942	62638	5,95	141	32	17	
N-0014	α -sinucleína	P37377	14506	4,74	119	37	7	
N-0016	Peroxirredoxina-2	P35704	21941	5,40	121	46	9	
N-0017	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina	P31044	20771	5,48	239	29	4	VDYGGVTVDELGK LYTLVLTDPDAPSR GNDISSGTVLSEYVGSPPK FKVESFR
N-0018	Fumarilacetoacetato hidrolasa dominio 2A	gi 149023223*	31309	9,17	74	41	7	

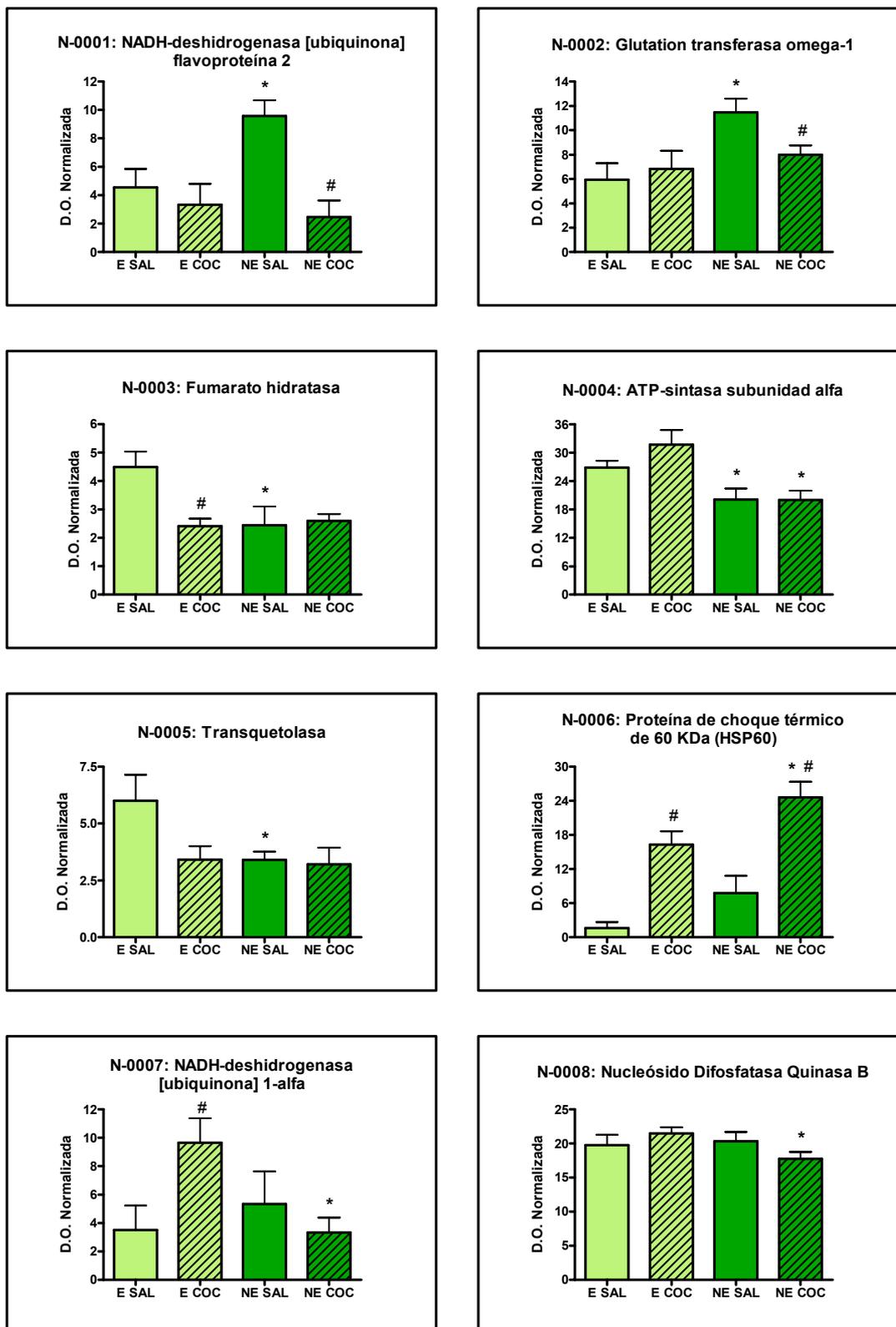


Figura 20: Expresión de las proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D.O.) normalizada \pm E.S.M. E SAL: grupo Extingue + Salino; E COC: grupo Extingue + Cocaína; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE COC: grupo No Extingue + Cocaína. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL (n=5).

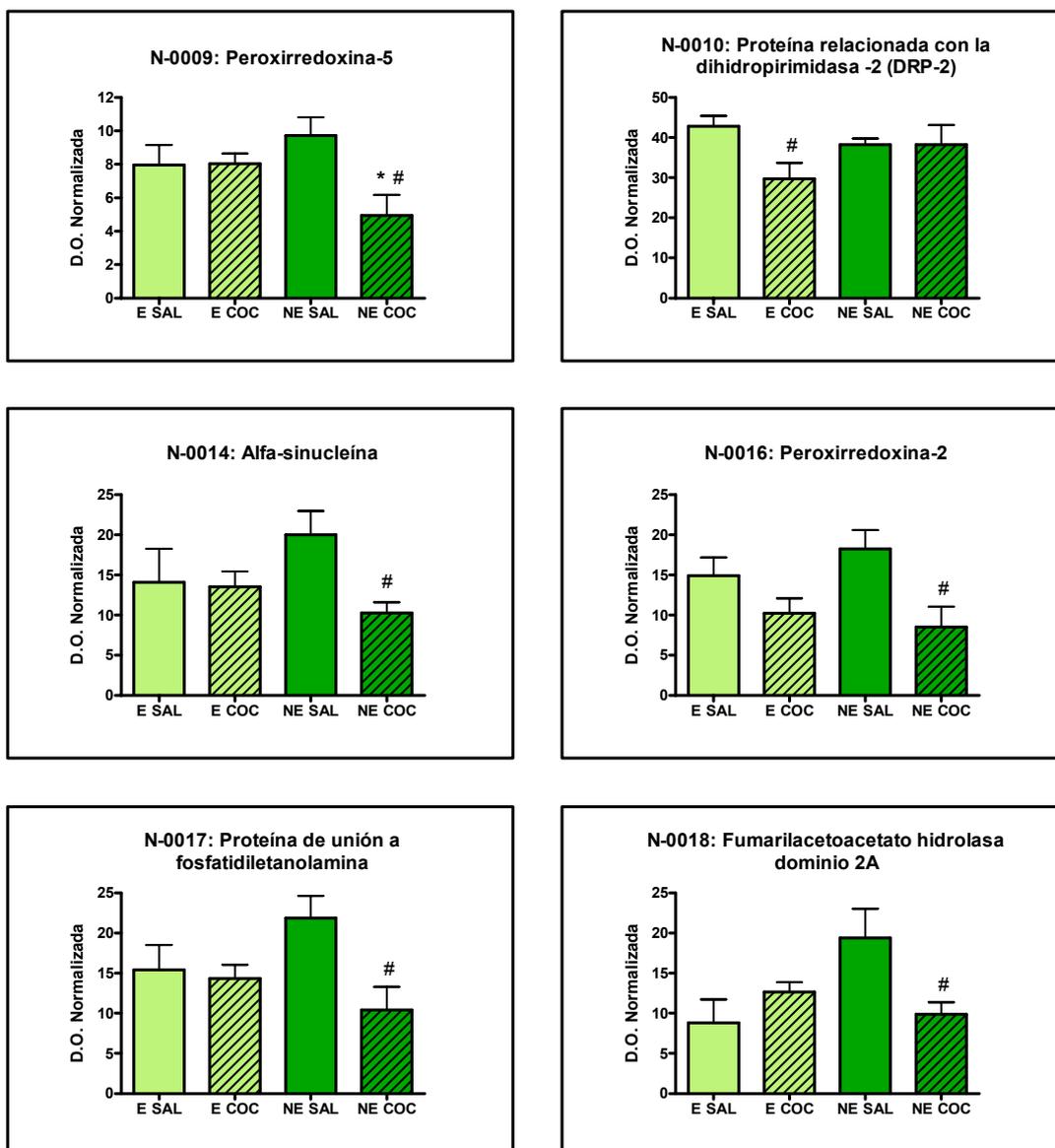


Figura 20: Continuación.

Tabla 13: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína. E SAL: grupo Extingue + Salino; E COC: grupo Extingue + Cocaína; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE COC: grupo No Extingue + Cocaína. n.s. diferencia no significativa en la comparación de estos grupos.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Ratio densidades ópticas normalizadas			
		NE SAL/ E SAL	NE COC/ E COC	E COC/ E SAL	NE COC/ NE SAL
N-0001	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2	1,68	n.s.	n.s.	0,26
N-0002	Glutation transferasa ω -1	1,93	n.s.	n.s.	0,70
N-0003	Fumarasa	0,65	n.s.	0,54	n.s.
N-0004	ATP-sintasa subunidad α	0,75	0,63	n.s.	n.s.
N-0005	Transquetolasa	0,57	n.s.	n.s.	n.s.
N-0006	Proteína de choque térmico de 60 KDa	n.s.	1,51	10,2	3,17
N-0007	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] 1- α	n.s.	0,35	2,75	n.s.
N-0008	Nucleósido Difosfatasa Quinasa B	n.s.	0,83	n.s.	n.s.
N-0009	Peroxirredoxina-5	n.s.	0,79	n.s.	0,65
N-0010	Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2 (DRP-2)	n.s.	n.s.	0,69	n.s.
N-0014	α -sinucleína	n.s.	n.s.	n.s.	0,51
N-0016	Peroxirredoxina-2	n.s.	n.s.	n.s.	0,47
N-0017	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina	n.s.	n.s.	n.s.	0,48
N-0018	Fumarilacetoacetato hidrolasa dominio 2A	n.s.	n.s.	n.s.	0,65

Como se ha explicado anteriormente, para obtener información sobre qué proteínas podían ser responsables de las diferencias en la velocidad de extinción de los animales obtenidos en el ensayo de CPP, se realizó una comparación de los proteomas del NAcc de los animales de los grupos entre **E SAL y NE SAL** y se encontraron diferencias significativas en la expresión de varias proteínas, de las cuales se identificaron 5 (figura 20, N-0001 - N-0005). En el grupo NE SAL se observó un descenso en la expresión de 3 proteínas relacionadas con el metabolismo energético: subunidad α de la ATP-sintasa (ATP5a1), fumarato hidratasa y transquetolasa. Por el contrario, se observó un aumento en la expresión de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2, la cual también está relacionada con el metabolismo energético, y de la glutatión transferasa ω -1 relacionada con el estrés oxidativo.

La ATP5a1 forma parte del núcleo analítico CF(1) de las ATP-sintasas de la clase F, las cuales transforman el ADP en ATP cuando existe un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial (Lee y col., 1990). La ATP5a1 parece también estar implicada en la liberación de neurotransmisores, ya que participa en el almacenamiento de los mismos en vesículas y en el transporte de Ca^{2+} (Chaudhary y col., 2001; Nicholls, 2003). La reducción en la expresión de esta enzima también se ha observado en el estriado de ratas sometidas a tratamiento crónico de morfina (Bierczynska-Krzysik y col., 2006) y, en el cerebro de ratones expuestos a tratamientos con alcohol en la etapa prenatal (Sari y col., 2010) Además la subunidad β de esta enzima también se ha visto regulada a la baja en NAcc de víctimas de sobredosis de cocaína (Tannu y col., 2007).

La fumarato hidratasa es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la conversión de fumarato en malato en la matriz mitocondrial (McGrath, 2003). La expresión de esta proteína no sólo descendió en el grupo NE SAL con respecto al E SAL, como se ha comentado anteriormente, sino que también descendió de forma significativa en los animales E COC al compararlos con E SAL, alcanzando valores similares a los de los animales que no extinguieron la preferencia por cocaína (figura 20, N-0003). En este sentido, se ha descrito que la adicción a cocaína puede ser reinstaurada en animales tras una única nueva administración de la droga (Itzhak y Martin, 2002); por ello, aunque no hayamos comprobado este fenómeno en nuestras condiciones experimentales, podría ser previsible que los animales del grupo E COC reinstauraran la conducta de búsqueda de cocaína al recibir una nueva administración de esta sustancia. Según esta teoría la fumarato hidratasa podría ser un buen marcador de vulnerabilidad diferencial a la adicción a cocaína y su nivel de expresión estaría inversamente relacionado con la tendencia a la recaída en la conducta adictiva.

La transquetolasa es una enzima dependiente de tiamina que cataliza múltiples reacciones no oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato (Horecker, 2002). Se han detectado variaciones en la actividad de esta enzima en numerosas patologías como el cáncer, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Wernicke-Korsakoff (Coy y col., 2005). En lo que se refiere al abuso de drogas, nuestros resultados (figura 20, N-0005,) junto a los descritos en la literatura parecen indicar que esta proteína también podría tener alguna implicación, ya que también se han detectado alteraciones en la expresión de esta enzima en distintas regiones cerebrales de pacientes alcohólicos (Lavoie y Butterworth, 1995), así como en ratas expuestas a nicotina (Li y Wang, 2007) o a morfina (Kim y col., 2005).

La NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2 es una subunidad de la NADH ubiquinona oxidorreductasa perteneciente al complejo I de la cadena respiratoria, el cual cataliza la oxidación de NADH acoplada a la reducción de ubiquinona y a la salida de protones de la mitocondria (Talpade y col., 2000). Varios autores han relacionado esta proteína con el consumo de drogas; así se ha descrito que los niveles de expresión de esta enzima disminuyen con el consumo de nicotina (Corner y col., 2001), de alcohol (Belly col., 2006) o de morfina (Morrón y col., 2007); en cambio, sus niveles se ven aumentados en ratas en periodo de abstinencia de anfetamina (Freeman y col., 2005). Estos datos podrían presentar un cierto paralelismo con nuestros resultados, ya que en nuestro estudio observamos que la expresión de esta proteína era mayor en los animales que no extinguían la conducta de búsqueda de cocaína (figura 20, N0001, comparación NE SAL vs E SAL).

La proteína glutathion transferasa ω -1 conjuga el glutathion con metabolitos reactivos, entre los que se encuentran los productos del estrés oxidativo (Parraga y col., 1998). En el SNC el estrés oxidativo puede producirse por la exposición a diferentes drogas de abuso, entre las que se encuentra la cocaína (Poon y col., 2007; Bashkatova y col., 2006). Y así, algunos de los efectos tóxicos de la cocaína se producen por la acción de sus metabolitos oxidativos (Auki y col., 1997); por ello se ha hipotetizado que en consumidores de cocaína el metabolismo eficiente de dicha droga y de sus metabolitos tóxicos podría contribuir al uso persistente de la misma (Guindalini y col., 2005). En este sentido, se ha observado que los consumidores de cocaína presentan con mayor frecuencia que los no consumidores una alteración genética que se traduce en una mayor actividad de la glutathion transferasa (Guindalini y col., 2005). Estos datos están en concordancia con nuestros resultados, ya que en el grupo NE SAL se observó un

aumento de la expresión de esta enzima cuando se comparó con el grupo E SAL (figura 20, N-0002).

Es interesante comentar que la expresión tanto de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2 como de la glutatión transferasa ω -1 se redujo significativamente en el grupo NE COC con respecto al NE SAL hasta alcanzar valores similares a los de los animales que extinguieron la preferencia por la droga. Estos resultados podrían indicar que la administración de una nueva dosis de cocaína podría revertir algunas de las alteraciones proteómicas de los animales que no extinguieron la preferencia por la droga. Este patrón de cambios es compatible con un estado de dependencia física. Teniendo esto en cuenta, podría decirse que el incremento en la expresión de dichas proteínas podría contribuir a la aparición del síndrome de abstinencia y, en consecuencia, al mantenimiento de la conducta de búsqueda de la droga.

Por otro lado, se comparó el proteoma del NAcc de las ratas que extinguieron y que no extinguieron la preferencia por cocaína después de una única administración de cocaína (comparación **E COC vs NE COC**) para observar si el patrón de cambio de las proteínas inducido por el consumo agudo de la droga es diferente en animales con distinta vulnerabilidad a la adicción a cocaína. En este caso se identificaron 5 proteínas que mostraban diferencias significativas (figura 20; N-0004 y N-0006 – N-0009). Una de ellas, la proteína de choque térmico de 60 kDa, (HSP-60), estaba sobreexpresada en el grupo NE COC y las 4 proteínas restantes estaban reguladas a la baja en dicho grupo: ATP5a1, NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] 1- α , nucleósido difosfatasa quinasa B y peroxirredoxina-5.

La HSP-60 también mostró un incremento significativo en las comparaciones E COC vs ESAL y NE COC vs NE SAL; sin embargo no varió al comparar los grupos E SAL y NE SAL (figura 20, N-0006). Todo ello parece indicar que el aumento en la expresión de la HSP-60 sería más un reflejo del consumo agudo de cocaína que de la vulnerabilidad a la adicción a dicha sustancia. La HSP-60 actúa como chaperona molecular facilitando el correcto plegamiento de las proteínas y corrigiendo los fallos en dicho plegamiento que se producen en situaciones de estrés en la matriz mitocondrial (Latchman, 2004). Todo lo cual es compatible con la capacidad de la cocaína para producir estrés oxidativo que se ha comentado anteriormente (Poon y col., 2007; Bashkatova y col., 2006).

En cuanto a la ATP5a1, como se ha descrito anteriormente, dicha proteína también estaba expresada a la baja en el grupo NE SAL con respecto al E SAL, por lo que en este

caso, y a diferencia de lo comentado para otras proteínas, la administración de una nueva dosis de la droga no consiguió revertir la alteración en la expresión de la ATP5a1 que aparece en los animales que no extinguen la preferencia por cocaína. En dichos animales el descenso en la expresión de esta proteína sería persistente. Estos datos muestran cierta concordancia con los obtenidos por Lull y colaboradores (2009), ya que dichos autores describieron que la expresión de la subunidad beta de esta proteína se mantenía alterada tras 100 días de abstinencia en la CPF de ratas que se autoadministraban cocaína. Estas alteraciones persistentes podrían contribuir al mantenimiento de la conducta de búsqueda de la droga y podrían favorecer las recaídas en el consumo, por lo que la ATP5a1 podría ser un buen biomarcador de vulnerabilidad a la adicción a cocaína.

La NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] 1- α es una subunidad de la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complejo 1 de la cadena respiratoria). Como se ha explicado anteriormente, otra subunidad de dicho complejo, la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2, se encontraba sobreexpresada en el grupo de ratas que no extinguía la preferencia por la cocaína. Todo esto confirmaría la implicación del complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial en la vulnerabilidad a los efectos de la cocaína.

La nucleósido difosfatasa quinasa B desempeña un papel importante en la síntesis de nucleósido trifosfatos, como el ATP (Ishikawa y col., 1992). En la literatura no existen actualmente datos que relacionen dicha proteína con el consumo de drogas; sin embargo, la variación detectada en nuestro estudio estaría en la línea de las variaciones que también detectamos en otras proteínas implicadas en la síntesis de ATP (como la ATP5a1 o la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona]).

La peroxirredoxina-5 pertenece a la familia de las peroxirredoxinas, enzimas antioxidantes que controlan también los niveles de peróxidos inducidos por citoquinas (Rhee y col., 2005). Algunos miembros de esta familia son regulados por acción de las drogas de abuso (para revisión consultar Li y Wang, 2007). En el caso de la peroxirredoxina-5, se ha descrito que el tratamiento agudo con metanfetamina produce un aumento en la expresión de esta enzima en el estriado de la rata (Iwazaki y col., 2006). Además, como se comentará más adelante, en nuestro estudio también detectamos variaciones de la peroxirredoxina- 2 (PRDX-2) al establecer comparaciones entre otros grupos experimentales.

Por último, algunas proteínas sólo mostraron variaciones al comparar los grupos E COC y NE COC con su salino correspondiente, por lo que dichas proteínas sólo serían

reflejo del efecto agudo de la droga y no estarían necesariamente relacionadas con la vulnerabilidad diferencial. De entre ellas, se pudieron identificar la DRP-2, la α -sinucleína, la PRDX-2, la proteína de unión a fosfatidiletanolamina y la fumarilacetoacetato hidrolasa dominio 2A (figura 20, N-0010 – N-0018).

La expresión de la DRP-2 disminuye tras la administración de cocaína en los animales que extinguen la conducta de búsqueda de la droga (comparación E COC vs ESAL, figura 20, N-0010). Esta proteína interviene en el crecimiento del axón actuando como mediadora de la respuesta intracelular a la semaforina 3 (o colapsina, Ujike y col., 2006). Nuestros datos coinciden con los obtenidos recientemente por Tannu y colaboradores (2010) ya que dichos autores también detectaron un descenso en la expresión de la DRP-2 en el NAcc de monos *rhesus* tras la autoadministración de cocaína. Más aún, otros psicoestimulantes, como la metanfetamina, también producen variaciones en la expresión de esta proteína en la corteza y en el estriado de la rata, tanto en exposiciones agudas como tras administraciones repetidas, lo cual se ha relacionado con el efecto neurotóxico de esta sustancia (Kobeissy y col., 2009; Faure y col., 2009; Iwazaki y col., 2007).

En cuanto a la α -sinucleína, la PRDX-2, la proteína de unión a fosfatidiletanolamina y la fumarilacetoacetato hidrolasa dominio 2A, todas ellas mostraron el mismo patrón de cambios: su expresión aumentó, aunque no significativamente, en el grupo NE SAL y se redujo significativamente en el grupo NE COC con respecto al NE SAL, alcanzando valores similares a los de los animales que extinguieron la preferencia por la droga (figura 20; N-0014 – N-0018). Dicho patrón es similar al descrito para la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2 y la glutatión transferasa ω -1 y, como ya se ha discutido, podría ser indicativo de que dichas proteínas podrían estar implicadas en el síndrome de abstinencia de cocaína. En el caso de la α -sinucleína, los datos de la literatura confirmarían esta hipótesis ya que estudios recientes relacionan los niveles en sangre de α -sinucleína con la intensidad y la frecuencia del craving de los adictos a la cocaína en periodos de abstinencia (Mash y col., 2008). Para la PRDX-2, la proteína de unión a fosfatidiletanolamina y la fumarilacetoacetato hidrolasa dominio 2A no se han encontrado en la literatura datos que las relacionen directamente con la dependencia física a cocaína, si bien parece que las dos primeras pudieran estar implicadas en otros aspectos relacionados con el consumo de psicoestimulantes. Así, se ha descrito una reducción en la expresión de PRDX-2 en el NAcc de monos *rhesus* que se autoadministran cocaína y en el de víctimas de sobredosis de cocaína (Tannu y col., 2007; 2010). En cuanto a la

proteína de unión a fosfatidiletanolamina, se ha observado una disminución de su expresión en la corteza cerebral de ratas tratadas de forma aguda con metaanfetamina (Kobeissy y col., 2010).

3.1.1.1. Análisis de la fosforilación de proteínas del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína

Como se describió en la Introducción, la fosforilación es la modificación post-trasduccional más frecuente que sufren las proteínas y puede modificar su función, su actividad, su degradación y su interacción con otras proteínas (Zolnierowicz y col., 2000; Morrison y col., 2002). La fosforilación es catalizada por múltiples quinasas entre las que se incluye la proteinkinasa A, cuya implicación en los efectos de la cocaína ha sido ampliamente estudiado (Nestler y col., 2001). Por ello decidimos ampliar el estudio proteómico del NAcc realizando un análisis masivo de la fosforilación de proteínas. Debido a la imposibilidad de realizar el ensayo con el NAcc de todos los grupos experimentales, se decidió llevarlo a cabo sólo con los grupos E SAL y NE SAL.

En este estudio se detectaron 16 puntos cuyo volumen varió significativamente al comparar los grupos E SAL y NE SAL. La tabla 14 muestra los valores de los volúmenes de estos puntos y el ratio NE SAL / E SAL.

Tabla 14: Puntos cuyo volumen varió significativamente en el estudio de fosforilación de proteínas realizado con el NAcc de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del volumen de cada punto. E SAL: grupo Extingue + Salino; NE SAL: grupo No Extingue + Salino.

Ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína			
	E SAL (n=3)	NE SAL (n=3)	
Nº Punto	Volumen punto	Volumen punto	Ratio NE SAL/ E SAL
F-0048	699,00 \pm 33,05	0,00	0/699
F-0065	540,40 \pm 17,60	235,40 \pm 117,70	0,43
F-0066	544,70 \pm 147,20	111,10 \pm 55,83	0,20
F-0077	864,40 \pm 110,30	268,50 \pm 179,20	0,31
F-0131	1121,00 \pm 44,68	452,50 \pm 63,81	0,40
F-0134	527,20 \pm 85,84	109,90 \pm 64,91	0,21
F-0176	440,90 \pm 223,20	1336,00 \pm 68,39	3,03
F-0185	333,20 \pm 7,42	674,40 \pm 69,77	2,04
F-0186	354,40 \pm 200,80	1090,00 \pm 547,20	3,03
F-0189	495,30 \pm 495,30	1831,00 \pm 56,09	3,70
F-0283	945,80 \pm 495,80	2499,00 \pm 205,60	2,63

Tabla 14: Continuación

Ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína (Continuación)			
	E SAL (n=3)	NE SAL (n=3)	
Nº Punto	Volumen punto	Volumen punto	Ratio NE SAL/ E SAL
F-0310	640,60 ± 328,80	2087,00 ± 207,50	3,23
F-0318	282,80 ± 172,10	594,70 ± 29,37	2,08
F-0403	481,30 ± 108,20	1055,00 ± 235,10	2,17
F-0424	615,70 ± 59,84	1468,00 ± 168,00	2,38
F-0438	243,60 ± 59,54	528,80 ± 24,79	2,17

La figura 21 muestra un gel representativo en el que se señalan los puntos que mostraron diferencias significativas en la comparación entre los grupos E SAL y NE SAL. Todos estos puntos se intentaron identificar por espectrometría de masas, aunque finalmente se consiguió identificar correctamente 10, los cuales quedan reflejados en la tabla 15. Como puede observarse, en muchos de los puntos seleccionados se identificó más de una proteína, por lo que dichas proteínas no se tendrán en cuenta en la discusión de los resultados. En la figura 22 se representa gráficamente la densidad óptica de los puntos en los que sólo se identificó una proteína.

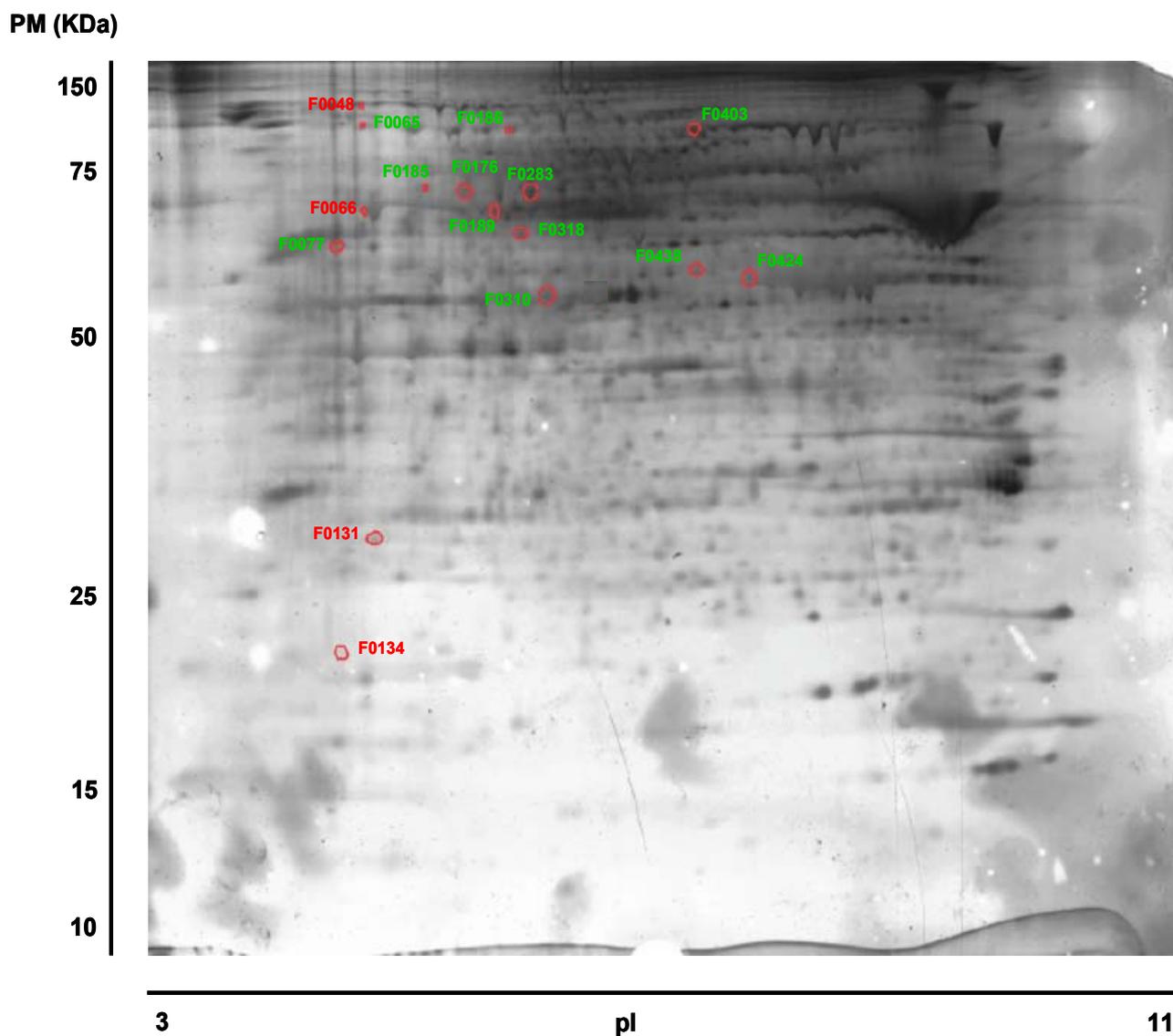


Figura 21: Gel bidimensional representativo de las proteínas fosforiladas del grupo E SAL de NAcc. Los puntos marcados en color rojo mostraron diferencias significativas al comparar grupos y los señalados en color verde, además, se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 15: Proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína identificadas por espectrometría de masas. PM: Peso molecular; pl: Punto isoeléctrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos NCBI.
*Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados
F-0077	2',3'- nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa	gi 57977323	47239	9,03	178	11	7
F-0176	Mezcla (Glucosa fosfato isomerasa/Piruvato quinasa / Isoforma 1 de la Sinapsina 2)	gi 46485440/ gi 16757994/ gi 77404242	62787/ 57781/ 63202	7,38/ 6,63/ 8,59	1152/ 912/ 403	32/ 27/ 26	30/ 22/ 10
F-0185	Sinapsina 2	gi 112350	52422	7,62	616	29	13
F-0186	Mezcla (Isoforma 1 de la Sinapsina 2/Proteína 1 de unión a syntaxina/Transketolasa)	gi 77404242/ gi 6981602/ gi 12018252	63417/ 67526/ 71141	8,73/ 6,49/ 7,23	580/ 362/ 252	20/ 8/ 17	15/ 8/ 11
F-0189	Mezcla (Precursor de la subunidad α de la ATPsintasa / Glutamato deshidrogenasa 1 / Subunidad 12 de proteasoma 26 no ATPasa/ Dihidrolipoamida deshidrogenasa)	gi 203055/ gi 6980956/ gi 54400716/ gi 40786469	58790/ 61377/ 52903/ 54004	9,22/ 8,05/ 7,02/ 7,96	643/ 563/ 341/ 312	24/ 27/ 21/ 13	14/ 18/ 12/ 7
F-0283	Sinapsina 2	gi 112350	52422	7,62	1247	32	29
F-0318	Mezcla (Septina 11I / Proteína dependiente de calcio/calmodulina α quinasa II)	gi 38328220/ gi 6978593	49750/ 54081	6,24/ 6,61	490/ 295	19/ 17	13/ 11
F-0403	Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2	P47942*	62239	5,95	610	23	15
F-0424	Creatina quinasa	gi 31542401	42699	5,33	435	32	13
F-0438	Quiinasa 1 de la proteinquinasa activada por mitógeno (MAP2K1)	gi 13928886	43437	6,18	469	19	15

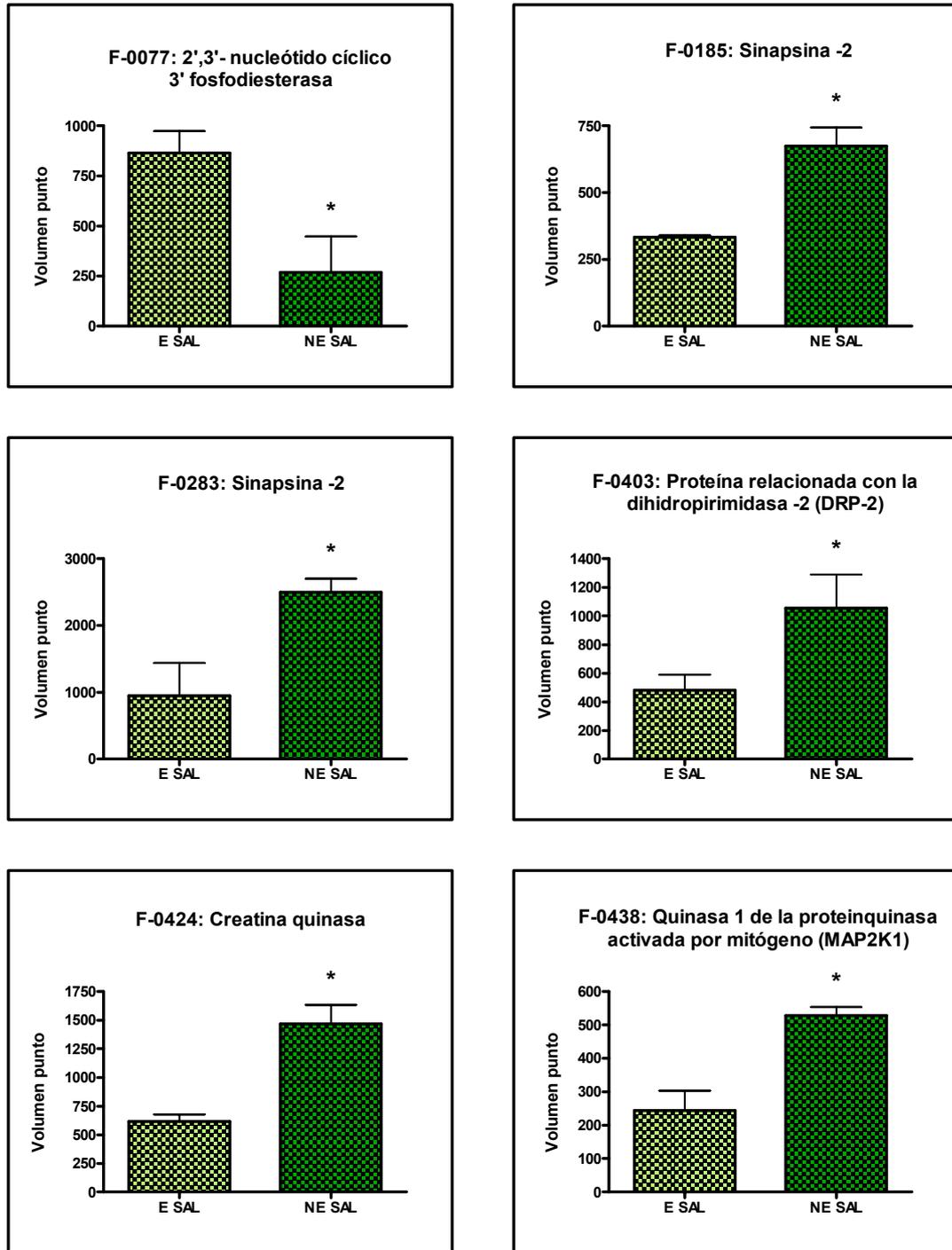


Figura 22: Expresión de las proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D:O.) normalizada \pm E.S.M. E SAL: grupo Extingue + Salino; NE SAL: grupo No Extingue + Salino. * $p < 0,05$. (n=3)

Entre las proteínas fosforiladas cuya expresión varió significativamente al comparar los grupos NE SAL y ESAL, se identificaron 4 cuya expresión fue mayor en el grupo NE SAL: sinapsina-2, DRP-2, creatina quinasa y la quinasa 1 de la proteinquinasa activada por mitógeno (MAP2K1). Se identificó también una proteína que estaba más expresada en E SAL: la 2',3'- nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa (CNPasa).

La sinapsina 2 se detectó en dos de los puntos analizados (figura 22; F-0185 y F-0283), lo que puede deberse a la fosforilación en diversas posiciones de la molécula. Las sinapsinas son una familia de fosfoproteínas que están específicamente asociadas a la cara citoplasmática de la membrana de las vesículas sinápticas (De Camilli y col., 1983). Estas proteínas están implicadas en la sinaptogénesis y en la regulación de la liberación de transmisores en los terminales nerviosos (Valtorta y col., 1992), lo cual explicaría que la alteración de estas proteínas se relacione con varias enfermedades neuropsiquiátricas. En concreto, se han detectado alteraciones en la expresión de sinapsina-2 en la esquizofrenia, el trastorno bipolar y el Parkinson (Vawter y col., 2002; Shi y col., 2009). Las sinapsinas parecen estar implicadas en la capacidad de la cocaína para aumentar la liberación de dopamina, ya que en animales knock-out para todas las isoformas de sinapsina la cocaína induce una menor liberación de dopamina que en los animales control (Kile y col., 2010). Este descubrimiento podría explicar el hecho de que en nuestro estudio detectáramos un aumento en la expresión de la sinapsina-2 en los animales que no extinguieron la preferencia por cocaína. Nuestro resultado concuerda además con el aumento en la expresión de la sinapsina-1 y la sinapsina-2 en la corteza de ratas tratadas con metaanfetamina, descrito por otros autores (Kobeissy y col 2009; Faure y col., 2009).

La familia de las proteínas relacionadas con la dihidropirimidasa (DRP) promueven el crecimiento axonal, la ramificación de las neuritas y la formación y crecimiento de los conos (Fukata y col., 2002; Hotta y col., 2005; Inagaki y col., 2001; Schmidt y Strittmatter, 2007). El miembro mejor caracterizado de dicha familia es la DRP-2. En este estudio los niveles de expresión de esta proteína fueron superiores en los animales que no extinguieron la conducta de búsqueda de cocaína (figura 22, N-0403). Esta proteína también ha sido identificada en el análisis de proteínas totales del NAcc, anteriormente descrito. El hecho de que en dicho estudio sólo se detectaran diferencias significativas en la comparación E COC vs E SAL (ver figura 20, N-0010) puede deberse a que no se buscaron específicamente las proteínas fosforiladas. La fosforilación de esta proteína a través de las enzimas glucógeno sintetasa quinasa 3 y quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) es necesaria para la elongación del axón (Cole y col., 2006). En el apartado anterior ya se detallaron algunos datos de la literatura que relacionan la DRP-2 con la

exposición a psicoestimulantes (Kobeissy y col., 2009; Faure y col., 2009; Tannu y col., 2010). Sin embargo, resulta interesante añadir que en ratas tratadas con cocaína se detectó un aumento en la expresión de la DRP-2 que se mantuvo hasta 100 días después de la última administración de la droga, lo cual se relacionó con la alta tendencia a la recaída que presentan los adictos a esta sustancia (Lull y col., 2009). Estos datos, unidos a nuestros resultados, podrían confirmar el papel de DRP-2 en la vulnerabilidad a la adicción a cocaína.

La creatina quinasa cataliza la conversión de creatina consumiendo para ello adenosín trifosfato (ATP) para crear fosfocreatina y adenosín difosfato (ADP). En tejidos que consumen rápidamente ATP, como el cerebro, la fosfocreatina sirve como reservorio de energía a partir del cual se puede volver a regenerar ATP (Wallimann y Hemmer, 1994). Actualmente existen datos que relacionan el consumo de diversas drogas de abuso con cambios en la expresión de la proteína creatina quinasa y con daño a nivel cardíaco o muscular (Zhu y col., 2007; Richards y col., 1999; Thót y Varga, 2009). Además, recientemente se ha descrito que en el NAcc de monos *rhesus* que se autoadministran cocaína se produce un aumento en la expresión de esta proteína (Tannu y col., 2010). Estos datos podrían correlacionarse con los nuestros ya que detectamos una mayor expresión de esta proteína en los animales del grupo NE SAL (figura 22, F-0424).

La proteína MAP2K1 (también denominada MEK1 o ERK quinasa 1) forma parte de la cascada de las MAP quinasas. MAP2K1 es activada por MAP3K, mediante fosforilación de residuos de serina y tirosina, y a su vez activa a MAPK. Como componente esencial de la ruta de las MAP quinasas, esta quinasa se encuentra implicada en multitud de procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación celular, la regulación de la transcripción y el desarrollo. En concreto, en el SNC la MAP2K1 participa en el desarrollo de las proyecciones neuronales (Entrez Gene, 2010). Por otro lado, se ha descrito que la vía de las MAP quinasas, es regulada por múltiples drogas de abuso (Li y col., 2008) y está implicada en varios aspectos de la drogodependencia, como la tolerancia, la sensibilización, el refuerzo o la abstinencia (Lee y Messing, 2008). En el caso concreto de la cocaína, se ha descrito que la activación de la vía de las MAP quinasas potencia la conducta de búsqueda de la droga en animales abstinentes expuestos a claves contextuales que previamente habían sido asociados con la administración de dicha droga (Lu y col., 2004). Estos datos concuerdan con el aumento de la expresión de la forma activa de la MAP2K1 detectada en los animales NE SAL de

nuestro estudio (figura 22, F-0438); por lo que esta proteína podría ser un buen indicador de vulnerabilidad a la adicción a cocaína.

La CNPasa es una proteína de membrana que conecta la tubulina con la membrana y regula la distribución citoplasmática de los microtúbulos (Bifulco y col., 2002). Su expresión disminuyó en el grupo NE SAL (figura 22, F-0077). En línea con nuestros resultados, en la CPF de ratas abstinentes de morfina se ha detectado una disminución en la expresión de esta proteína, lo cual se ha sugerido que puede resultar en cambios en la estructura neuronal y la transmisión sináptica (Yang y col., 2007). Esta hipótesis también coincide en parte con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que la mayor parte de las proteínas detectadas (sinapsina-2, DRP-2 y MAP2K1) están implicadas en esos procesos.

3.1.2. Análisis proteómico de la CPF de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.

Después de la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional y tras su tinción con nitrato de plata se obtuvieron geles en los que se pueden observar una serie de puntos que corresponden al mapa proteico de la CPF de los animales seleccionados (ver un ejemplo en la figura 23). Para la detección, emparejamiento y análisis de la densidad óptica de los puntos se utilizó el programa PD-Quest 8.0.1. La tabla 16 muestra para cada grupo experimental la media del número de puntos detectados.

Tabla 16: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles de la CPF de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína. E SAL: Extingue + Salino; E COC: Extingue + Cocaína; NE SAL: No Extingue + Salino; NE COC: No Extingue + Cocaína. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M.

GRUPO	n	Puntos detectados
E SAL	6	936,5 \pm 132,3
E COC	6	975,3 \pm 118,2
NE SAL	6	810,2 \pm 64,81
NE COC	6	854,3 \pm 68,30

En la tabla 17 se muestran todas las proteínas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 17: Proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de la densidad óptica (D.O.) normalizada de cada proteína. E SAL: grupo Extingue + Salino; E COC: grupo Extingue + Cocaína; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE COC: grupo No Extingue + Cocaína. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL (n=6).

CPP COCAÍNA-CPF				
D.O. Normalizada				
Nº Punto	E SAL	E COC	NE SAL	NE COC
C-0011	9,52 \pm 0,90	9,50 \pm 2,50	5,39 \pm 1,35*	9,50 \pm 1,10 [#]
C-1512	116,60 \pm 21,89	163,80 \pm 20,15	112,76 \pm 20,37	104,10 \pm 13,85*
C-2305	11,11 \pm 0,78	17,03 \pm 2,54 [#]	13,20 \pm 4,04	12,50 \pm 1,77
C-2809	8,35 \pm 2,25	11,81 \pm 1,78	9,20 \pm 1,73	6,18 \pm 1,29*
C-3305	5,26 \pm 2,06	10,12 \pm 1,15	4,21 \pm 1,20	4,01 \pm 0,94*
C-3401	8,82 \pm 1,40	12,37 \pm 1,82	9,50 \pm 2,39	6,90 \pm 1,25*
C-3501	3,74 \pm 1,03	5,95 \pm 0,84	5,18 \pm 1,31	3,17 \pm 0,86*
C-3503	4,65 \pm 0,92	6,82 \pm 1,29	4,68 \pm 1,41	2,45 \pm 0,90*
C-3802	24,54 \pm 8,82	30,47 \pm 4,04	31,88 \pm 7,98	10,27 \pm 2,86 ^{#*}
C-3808	3,64 \pm 1,52	3,56 \pm 0,90	5,69 \pm 1,50	1,45 \pm 0,59 [#]
C-4202	88,15 \pm 6,59	98,32 \pm 12,67	64,03 \pm 7,42*	87,97 \pm 13,14
C-4204	2,17 \pm 0,74	4,97 \pm 0,61 [#]	3,58 \pm 1,56	3,40 \pm 1,15
C-4402	10,05 \pm 2,42	15,05 \pm 1,95	11,87 \pm 2,74	7,25 \pm 1,50*
C-4503	112,70 \pm 10,17	100,35 \pm 14,46	68,51 \pm 9,15*	87,05 \pm 12,65
C-5505	6,19 \pm 1,06	8,44 \pm 0,59	6,95 \pm 0,93	5,32 \pm 0,61*
C-6504	34,04 \pm 2,67	30,93 \pm 5,09	23,92 \pm 3,54*	32,93 \pm 3,65
C-6611	9,03 \pm 0,79	8,86 \pm 1,22	13,68 \pm 1,43*	10,09 \pm 0,87
C-6701	13,01 \pm 0,94	18,95 \pm 2,56	20,11 \pm 2,46*	15,34 \pm 1,87
C-6902	2,20 \pm 0,35	2,12 \pm 0,41	3,98 \pm 0,40*	3,08 \pm 0,64
C-7901	5,93 \pm 0,73	11,82 \pm 2,06 [#]	8,16 \pm 1,99	5,34 \pm 1,02*
C-8102	13,60 \pm 0,93	10,96 \pm 16,14	10,27 \pm 1,06*	12,99 \pm 1,21
C-8205	180,70 \pm 21,53	176,17 \pm 34,83	103,60 \pm 25,11*	183,50 \pm 23,66 [#]
C-8206	14,52 \pm 2,88	7,22 \pm 2,06	6,34 \pm 2,12*	10,35 \pm 1,50

En la figura 23 se muestra un gel representativo de las proteínas extraídas de la CPF. En dicho gel se han marcado las proteínas que mostraron diferencias significativas en las comparaciones anteriormente detalladas.

De entre todas las proteínas cuya densidad óptica varió significativamente, se seleccionaron aquellas en las que la variación de la densidad óptica fue al menos 1,5 veces superior al comparar un grupo con otro. En total se seleccionaron 21 proteínas. Finalmente se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 13 proteínas. Dichas proteínas se han señalado en color verde en el gel de la figura 23. Los datos de espectrometría de masas que sirvieron para la identificación de dichas proteínas se muestran en la tabla 18. En la figura 24 se representa gráficamente la densidad óptica de las proteínas identificadas.

A modo de resumen, en la tabla 19 se recogen las proteínas identificadas, indicando las comparaciones en las que mostraron diferencias significativas y, en esos casos, el ratio de variación.

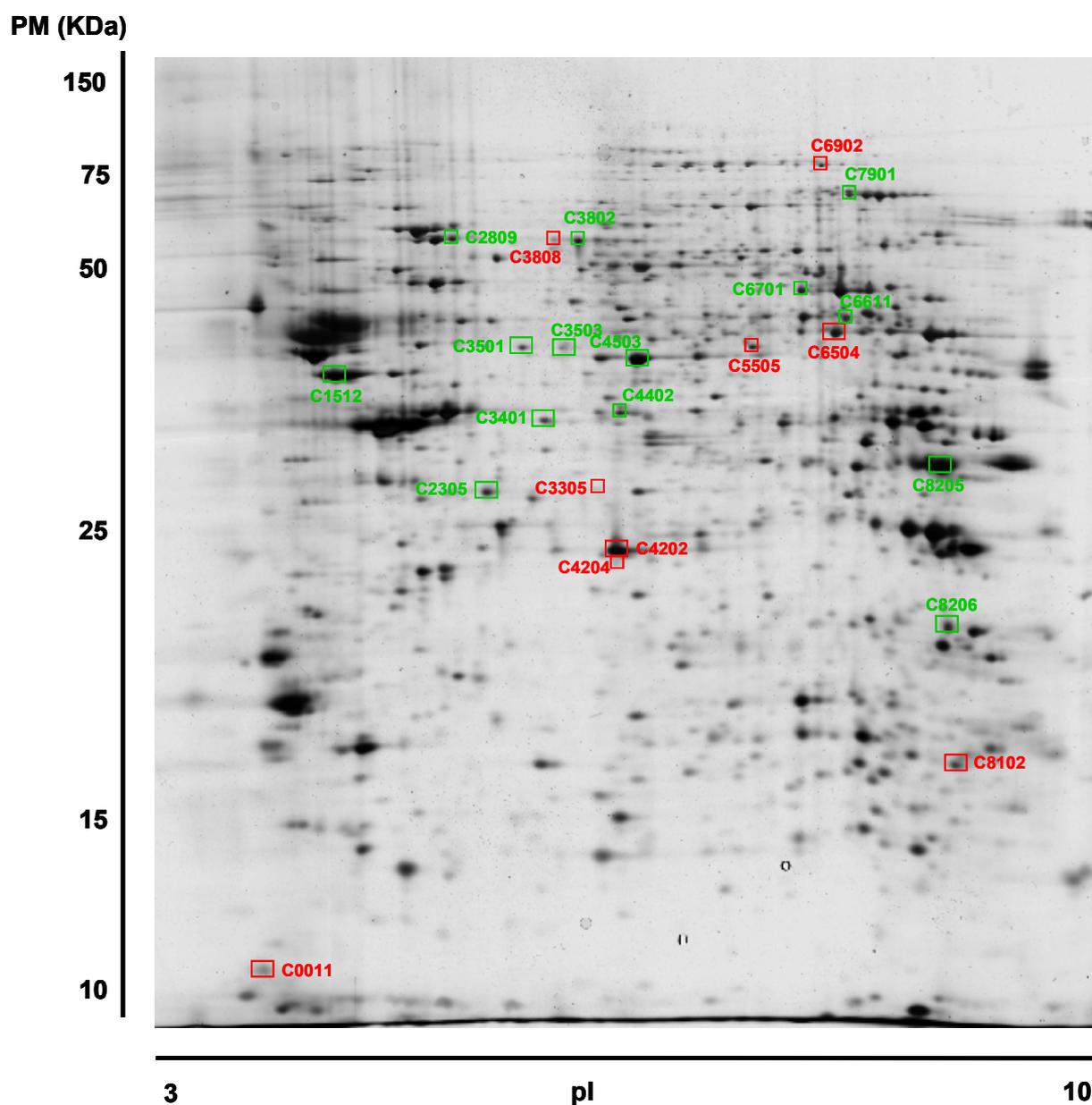


Figura 23: Gel bidimensional representativo de las proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína. Las proteínas marcadas mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos y las señaladas en color verde se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 18: Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína. PM: Peso molecular; pl: Punto isoelectrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot. *Código de las proteínas tomado de la base de datos del NCBI

Nº Punto	Nombre de la proteína	Código proteína	PM teórico (Da)	pl Teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados	Secuencia MS/MS
C-1512	γ-enolasa	P07323	47510	5,03	348	86	33	
C-2305	Isocitrato deshidrogenasa [NAD] subunidad α, precursor mitocondrial	Q99NA5	40044	6,47	223	51	27(65)	
C-3401	Succinato-Coenzima A ligasa, subunidad β	gij158749584*	50616	7,57	288	57	40(91)	
C-3501	2-oxoglutarato deshidrogenasa, succiltransferasa, residuo de dihidropolilisina	Q01205	49236	8,89	82	31	14/65	
C-3503	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2	Q6AY09	49547	5,89	148	48	23(65)	
C-4402	Mezcla (α-centractina/Ornitina aminotransferasa)	P85515/ P04182	42701/ 48701	6,19/ 6,53	78/ 57	18/ 23	1/1	VMAGALEGDIFIGPK/ HQVLFIADEIQTGLAR
C-4503	α-enolasa	P04764	47440	6,16	260	65	27(65)	
C-6611	Sinapsina-2	Q63537	63702	8,73	96	30	15(65)	
C-6701	Piruvato quinasa, isoforma M1	P11980	58294	6,63	112	39	16(63)	
C-7901	Aconitato hidratasa, precursor mitocondrial	Q9ER34	86121	7,87	83	23	14(65)	
C-8205	Fructosa-bisfosfato aldolasa A	P05065	39783	8,31	167	54	19(65)	
C-8206	Canal aniónico dependiente de voltaje, isoforma 1 (VDAC1)	Q9Z2L0	30851	8,62	250	79	21(65)	

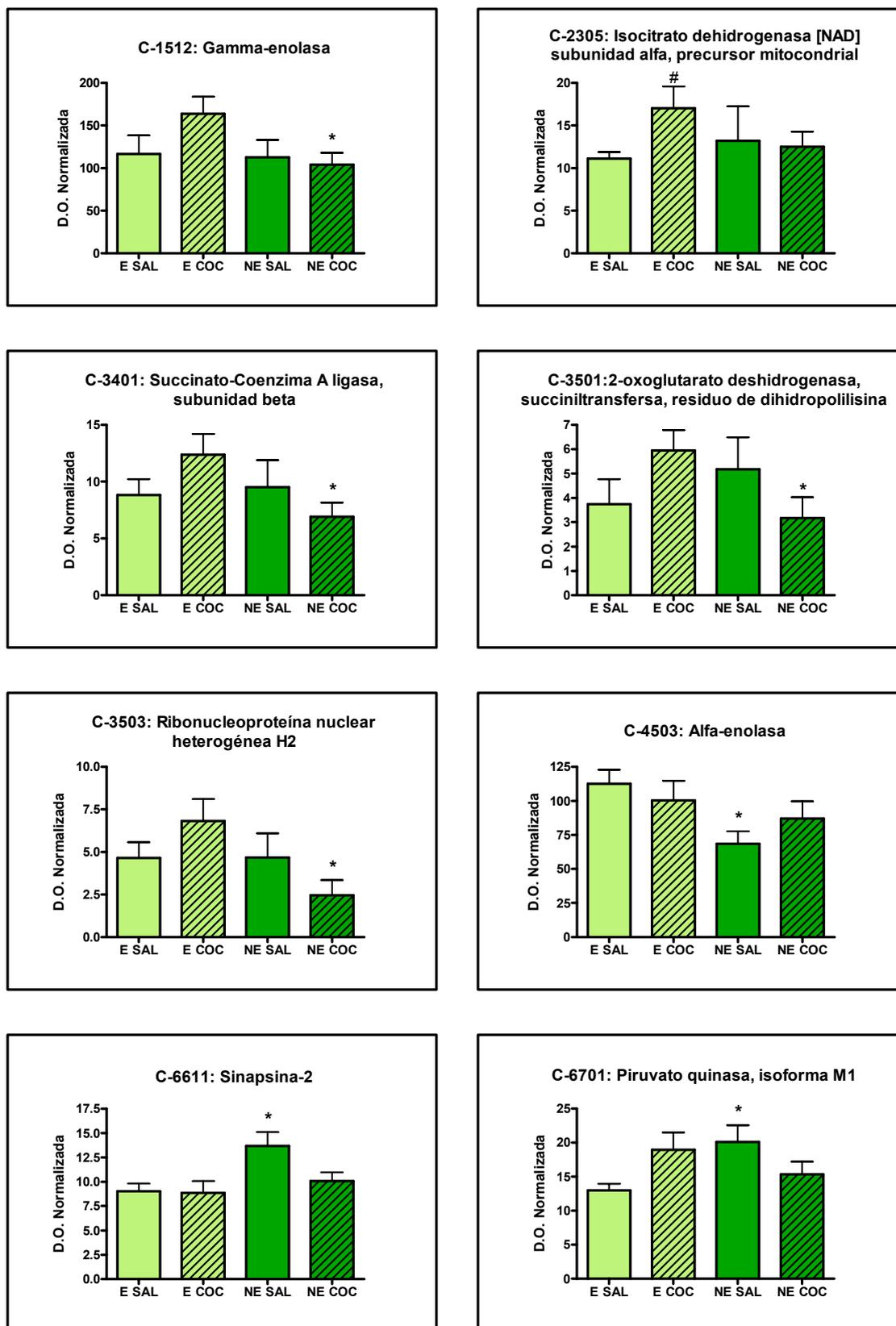


Figura 24: Expresión de las proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por cocaína identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D.O.) normalizada \pm E.S.M. E SAL: grupo Extingue + Salino; E COC: grupo Extingue + Cocaína; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE COC: grupo No Extingue + Cocaína. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL ($n=6$).

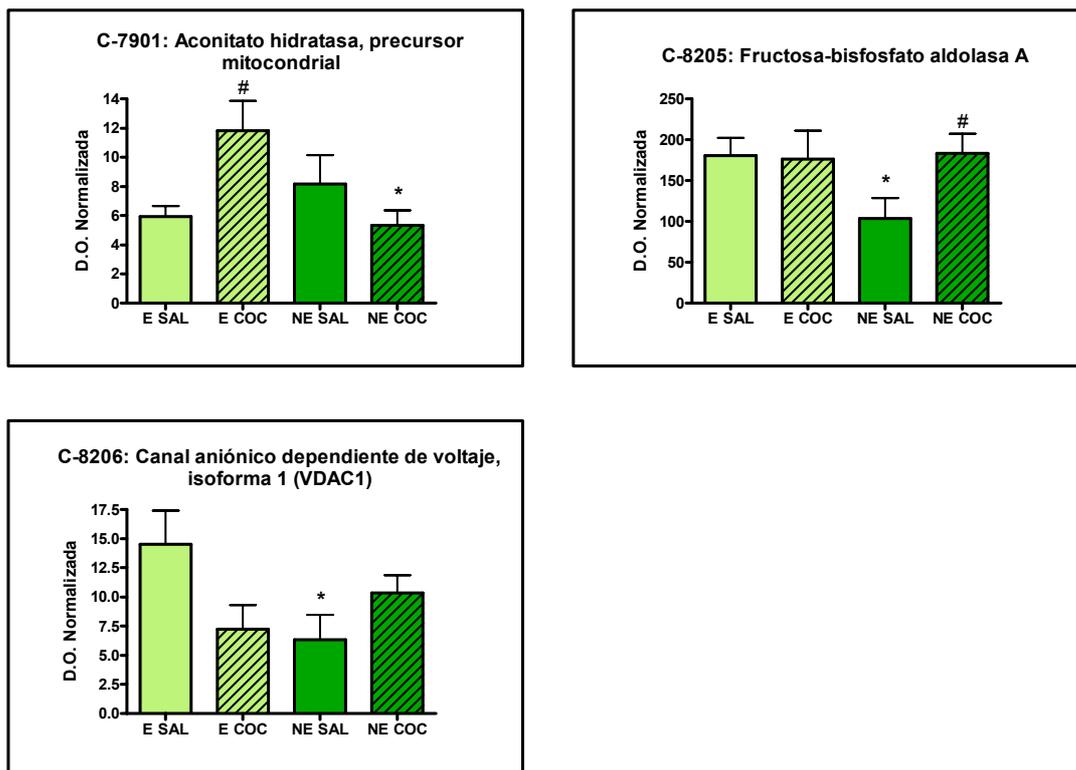


Figura 24: Continuación

Tabla 19: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína. E SAL: grupo Extingue + Salino; E COC: grupo Extingue + Cocaína; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE COC: grupo No Extingue + Cocaína. n.s. diferencia no significativa en la comparación de estos grupos.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Ratio densidades ópticas normalizadas			
		NE SAL/ E SAL	NE COC/ E COC	E COC/ E SAL	NE COC/ NE SAL
C-1512	γ -enolasa	n.s.	0,64	n.s.	n.s.
C-2305	Isocitrato dehidrogenasa [NAD] subunidad α , precursor mitocondrial	n.s.	n.s.	1,53	n.s.
C-3401	Succinato-Coenzima A ligasa, ADP-forming, subunidad β	n.s.	0,55	n.s.	n.s.
C-3501	2-oxoglutarato deshidrogenasa, succiltransferasa, residuo de dihidropolilisina	n.s.	0,53	n.s.	n.s.
C-3503	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2	n.s.	0,36	n.s.	n.s.
C-4503	α -enolasa	0,61	n.s.	n.s.	n.s.
C-6611	Sinapsina-2	1,52	n.s.	n.s.	n.s.
C-6701	Piruvato quinasa, isoforma M1	1,55	n.s.	1,99	n.s.
C-7901	Aconitato hidratasa, precursor mitocondrial	n.s.	0,45	n.s.	1,77
C-8205	Fructosa-bisfosfato aldolasa A	0,57	n.s.	n.s.	n.s.
C-8206	Canal aniónico dependiente de voltaje, isoforma 1 (VDAC1),	0,44	n.s.		

De la misma manera que se hizo con el NAcc, se comparó la expresión proteica de la CPF de los animales de los grupos **E SAL y NE SAL**, con el fin de identificar las proteínas responsables de la vulnerabilidad a la adicción a cocaína. En esta comparación se hallaron diferencias significativas en la expresión de 5 proteínas (figura 24; C-4503, C-6611, C-6701, C-8205, C-8206), de las cuales la mayoría, y al igual que ocurrió en el NAcc, están implicadas en el metabolismo energético. En concreto se trata de enzimas que participan en la glucólisis: fructosa-bifosfato aldolasa A, α -enolasa y la isoforma M1 de la piruvato quinasa. Las otras dos proteínas restantes, sinapsina-2 y la isoforma 1 del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1), están involucradas en la transmisión sináptica.

La fructosa-bifosfato aldolasa A, o aldolasa A, pertenece a la familia de las aldolasas que son enzimas que participan en la glucólisis catalizando el 4º paso en el que la fructosa 1,6-bifosfato se convierte en gliceraldehido 3-fosfato más dihidroxiacetona fosfato (Lorentzen y col., 2005). En vertebrados, la familia de las aldolasas comprende tres isoformas, A, B y C de las cuales sólo la A y la C se expresan preferentemente en cerebro (Buono y col., 2001). Las aldolasas A y C juegan un papel importante en el desarrollo y función del SNC, ya que ambas regulan la estabilidad de los neurofilamentos de bajo peso molecular, que son componentes fundamentales del citoesqueleto del axón (Canete-Soler, y col., 2005); por lo que se han descrito alteraciones en la expresión de ambas isoformas asociadas a la enfermedad de Alzheimer (Mor y col., 2005). En relación con la exposición a drogas de abuso, también se pueden encontrar interesantes datos en la literatura; así se han observado alteraciones significativas de la expresión de la aldolasa A en ratas tratadas con nicotina, con alcohol, o con morfina (Hwang, y Li, 2006; Bell y col., 2006; Li y col., 2006); mientras que se han descrito alteraciones en la expresión de la aldolasa C en ratas tratadas con metaanfetamina o morfina (Hamamura y col., 1999; Li y col., 2009) y en víctimas de sobredosis de cocaína (Tannu y col., 2007). En nuestro ensayo detectamos una disminución de los niveles de aldolasa A en los animales del grupo NE SAL al compararlos con los del grupo E SAL; sin embargo, en los animales del grupo NE COC la expresión de esta proteína aumentó significativamente con respecto al grupos NE SAL, hasta alcanzar valores similares a los de los animales que extinguieron la conducta de búsqueda de la droga (figura 24, C-8205). Como se ha comentado anteriormente en relación a algunas proteínas detectadas en nuestro estudio del NAcc, este patrón de cambios sugiere que esta proteína podría estar implicada en la abstinencia a cocaína. En cualquier caso, nuestros datos unidos a los recogidos en la literatura confirmarían la implicación de la aldolasa A en el potencial adictivo de la cocaína.

La enzima enolasa cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en el penúltimo paso de la glucólisis. Existen tres subunidades de dicha enzima: α , β y γ ; de forma que durante el desarrollo se produce una transición del homodímero α/α al heterodímero α/β en células de músculo estriado y al heterodímero α/γ en neuronas (Pancholi, 2001). En nuestro estudio detectamos una disminución de la expresión de la α -enolasa en los animales que no extinguieron la conducta de búsqueda de cocaína (figura 24, C-4503), por lo que niveles bajos de dicha enzima podrían aumentar la vulnerabilidad a los efectos de esta droga. Esta hipótesis es compatible con los datos recogidos en la literatura. Así, en monos *rhesus* que se autoadministran cocaína se ha observado un descenso en el NAcc de la expresión de las isoformas α y γ de la enolasa (Tannu y col., 2010). Más aún, estas alteraciones también se han detectado en el cerebro de ratas nacidas con síndrome fetal alcohólico (Ledig y col., 1989) y en el hipocampo de ratas adolescentes expuestas al consumo de alcohol durante 4 semanas (Hargreaves y col., 2008); por lo que parece que la enolasa podría estar también implicada en la vulnerabilidad al consumo de otras sustancias adictivas.

La piruvato quinasa es otra enzima que participa en la glucólisis catalizando el paso siguiente al realizado por la enolasa, que consiste en la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP. En mamíferos existen 4 isoformas: L, R, M1 y M2; de las cuales sólo la M1 se expresa en cerebro (Yamada y Noguchi, 1999). En los animales que no extinguieron la preferencia por cocaína, detectamos un aumento en la expresión de la isoforma M1 (figura 24, C-6701), lo cual podría ser un mecanismo compensatorio frente al descenso de la α -enolasa observado en estos animales. Otros investigadores también han descrito alteraciones en la expresión de esta enzima en el estriado de ratas tratadas de forma aguda con metaanfetamina (Iwazaki y col., 2006), en la corteza frontal de ratas dependientes de morfina (Kim y col., 2005), así como en corteza cerebral de pacientes alcohólicos (Lewohl y col., 2004); por lo que parece que esta enzima también pudiera estar implicada en los efectos de las drogas de abuso.

Como se ha explicado en el apartado anterior, la sinapsina-2 es una fosfoproteína que participa en la exocitosis de las vesículas sinápticas y por tanto, regula la liberación de neurotransmisores, entre los que se encuentra la dopamina (Valtorta y col., 1992; Kile y col., 2010). En este estudio esta proteína presentó mayores niveles de expresión en los animales NE SAL al compararlos con los E SAL (figura 24, C-6611). Este resultado coincide con el obtenido en el ensayo de fosforilación de proteínas realizado con el NAcc

de estos animales y confirmaría el posible papel de la sinapsina-2 como biomarcador de vulnerabilidad diferencial a la adicción a cocaína.

Como se ha indicado anteriormente, en nuestros experimentos también detectamos una menor expresión de la proteína VDAC1 al comparar el grupo NE SAL con el E SAL (figura 24, C-8206). VDAC1 es una de las 3 isoformas de los canales aniónicos dependientes de voltaje, también conocidos como porinas; estas proteínas se encuentran de forma predominante en la parte exterior de la membrana mitocondrial donde controlan la entrada y salida de nucleótidos de adenina (Blachly-Dyson y col., 1993). En humanos, se han detectado alteraciones en el ARNm de VDAC1 en el hipocampo de en enfermos del Alzheimer y en la corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia (Miller y col., 2008; Hakak y col., 2001). También se han encontrado cambios en la expresión de esta proteína en el estriado de ratas tratadas de forma aguda con metaanfetamina, así como en la CPF de ratas tratadas crónicamente con nicotina (Iwazaqui y col., 2006; Hwang y col., 2006); lo cual, unido a nuestros resultados, podría confirmar la implicación de VDAC1 en la adicción a psicoestimulantes.

También se realizó un estudio comparativo de la CPF de los animales del grupo **NE COC** frente a los del grupo **E COC** para detectar las variaciones en la expresión proteica derivadas de la administración aguda de cocaína en animales con distinta vulnerabilidad a los efectos de dicha droga. En este estudio se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de varias proteínas, de las cuales se identificaron correctamente 5. Tres de ellas son enzimas mitocondriales que participan en el ciclo de Krebs: la aconitato hidratasa (figura 24, C-7901), la subunidad β de la succinato-CoA sintetasa (figura 24, C-3401) y un componente de la oxoglutarato deshidrogenasa (figura 27, C-3501). Las dos restantes son la γ -enolasa, y la ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2 (figura 24, C-1512 y C-3503).

Como se ha explicado anteriormente, la enzima enolasa presente en las neuronas está formada por las subunidades α y γ . En nuestro estudio observamos un descenso en la expresión de la γ -enolasa al comparar el grupo NE COC con el E COC, lo cual concuerda con la disminución en la expresión de la α -enolasa detectada al comparar el grupo NE SAL con el E SAL. Todo ello, unido a los datos bibliográficos que relacionan cambios en la expresión de la enolasa con el consumo de drogas comentados anteriormente, convertiría a la enzima enolasa en un buen marcador de vulnerabilidad diferencial a la adicción a cocaína.

La ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2 pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas. Los miembros de esta familia forman complejos con el RNAm e intervienen en su procesamiento; por lo que influyen en la regulación de la expresión génica y en la síntesis de otras proteínas (Carpenter y col., 2006).

En cuanto a las 3 proteínas pertenecientes al ciclo de Krebs, en todas ellas el patrón de cambios fue similar: su expresión aumentó en el grupo E COC con respecto a los otros 3 grupos experimentales, si bien este aumento sólo fue significativo al compararlo con el grupo NE COC. La única excepción al patrón anteriormente mencionado lo presentó la aconitato hidratasa; en esta enzima el aumento en la expresión del grupo E COC no sólo fue significativo con respecto al grupo NE COC, sino que también lo fue frente al grupo E SAL (figura 24, C-7901). En este sentido, en nuestro estudio también detectamos un incremento significativo en la comparación E COC vs E SAL en la expresión de la enzima isocitrato deshidrogenasa (figura 24, C-2305), que cataliza el paso siguiente al de la aconitato hidratasa en el ciclo de Krebs (LaPorte, 1993). El incremento en la expresión de estas dos enzimas podría ser un mecanismo compensatorio frente al descenso en la expresión de otra enzima de este ciclo, la fumarato hidratasa, detectado en el NAcc estos mismos animales (ver figura 20, N-0003). En la línea de estos resultados, varios autores han demostrado que la expresión de estas y otras enzimas del ciclo de Krebs se ve alterada con el consumo no sólo de cocaína, sino también de otras drogas, como la nicotina, la morfina o el alcohol (Li y Wang, 2007).

3.1.3. Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas detectadas en el NAcc y la CPF de los animales procedentes del CPP de cocaína.

Para tener una visión global de los procesos biológicos que influyen en la velocidad de extinción de la conducta de búsqueda de cocaína, los datos obtenidos en el estudio del NAcc y de la CPF se agruparon y se analizaron con el programa "Ingenuity Pathways Analysis". Para este análisis se emplearon sólo las proteínas cuya expresión varió significativamente en las comparaciones NE SAL vs E SAL y NE COC vs ECOC.

La mayoría de las proteínas detectadas en ambas comparaciones se asociaron significativamente con la **producción de energía**, en concreto en tres procesos: glucolisis, fosforilación oxidativa y ciclo de Krebs. Como puede observarse en la figura 25 y en la tabla 20, las proteínas detectadas en la comparación NE SAL vs E SAL se incluyen principalmente en la glucolisis, mientras que las detectadas en la comparación

NE COC vs E COC se incluyen mayoritariamente en el ciclo de Krebs. Por otro lado, sólo en la comparación NE SAL vs E SAL también fueron significativos los procesos de “**organización y ensamblaje celular**” y “**comunicación y señalización celular**”. Sin embargo, las proteínas detectadas en la comparación NE COC vs E COC también se asociaron significativamente con la **respuesta al estrés**.

El programa “Ingenuity Pathways Analysis” también se utilizó para generar redes de conexiones entre las proteínas identificadas en cada análisis. En las figuras 26 y 27 se muestran dichas redes para las comparaciones NE SAL vs E SAL y NE COC vs E COC, respectivamente. En dichas redes y en la tabla 20, también se puede comprobar que en la comparación NE COC vs E COC prácticamente todas las proteínas, menos la HSP-60, se expresan menos en el grupo NE COC que en el E COC; este fenómeno no se observa al comparar los animales tratados con salino. Estos hechos indicarían que en los animales más vulnerables, la administración de una nueva dosis de la droga reprime la actividad de los procesos biológicos que parecen estar involucrados en la vulnerabilidad a los efectos de las drogas de abuso.

Tabla 20: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de cocaína. Las proteínas marcadas en verde presentaron mayor expresión en los animales NE, las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en los animales E. (n.s., proceso no significativo).

PROCESO BIOLÓGICO	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN EL CPP DE COCAÍNA	
	NE SAL vs E SAL	NE COC vs E COC
Glucolisis	- α -enolasa -Fructosa-bifosfato aldolasa A -Piruvato quinasa, isoforma M1	- γ -enolasa
Fosforilación oxidativa	- NADH-deshidrogenasa [ubiquinona], flavoproteína 2, (NDUFV2) - ATP-sintasa, subunidad α	- NADH-deshidrogenasa [ubiquinona], 1- α - ATP-sintasa, subunidad α
Ciclo de Krebs	- Fumarato hidratasa	- Aconitato hidratasa - Succinato-CoA sintetasa, subunidad β - oxoglutarato deshidrogenasa
Organización y ensamblaje celular	-2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa -Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2 -Quinasa 1 de la proteinquinasa activada por mitógeno (MAP2K1)	n.s.
Comunicación y señalización celular	-Sinapsina II -Canal aniónico dependiente de voltaje, isoforma 1 (VDAC1)	n.s.
Respuesta al estrés	n.s.	- Proteína de choque térmico de 60 kDa, (HSP-60) - Peroxirredoxina 5

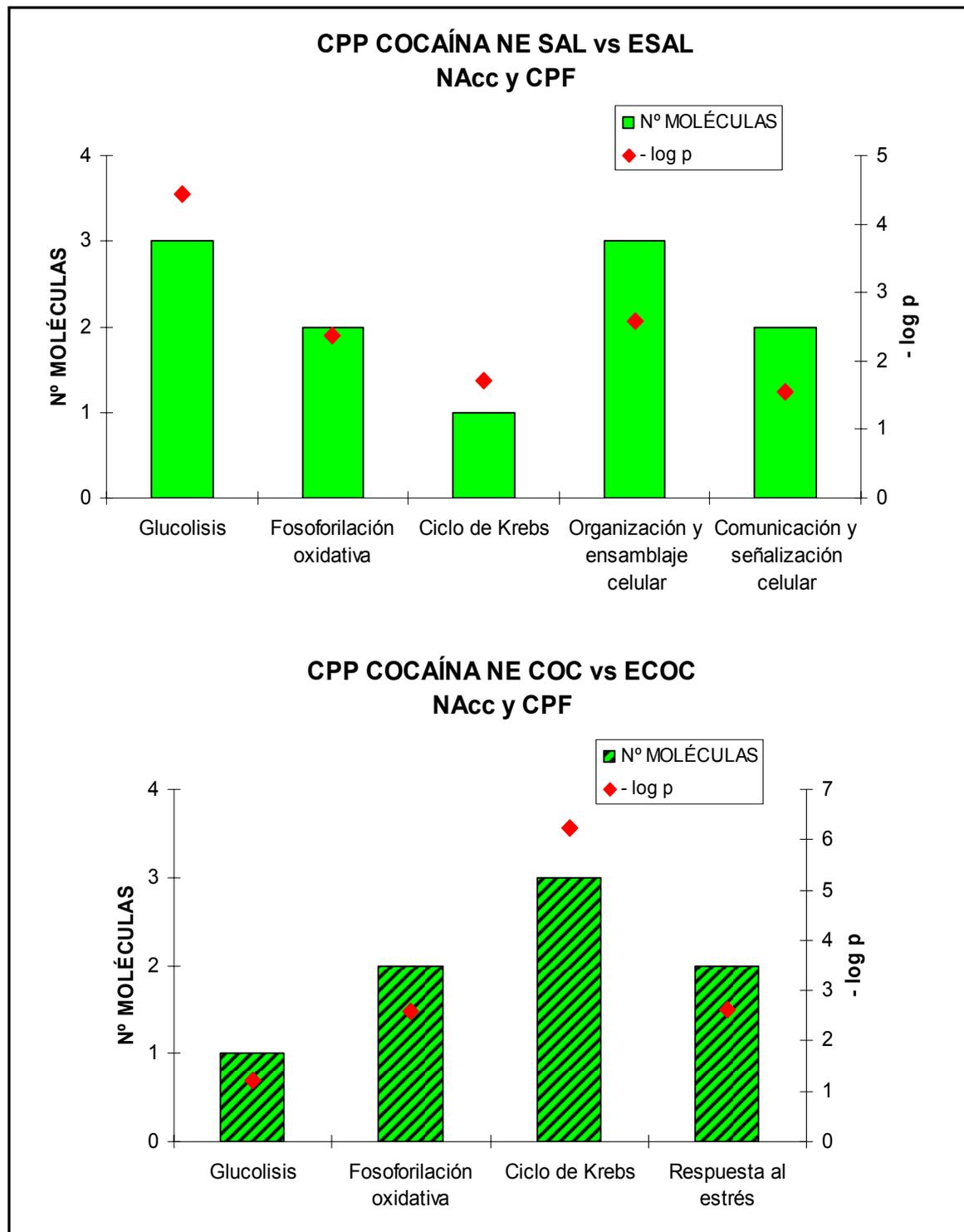


Figura 25: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de cocaína.

Abreviaturas de las proteínas incluidas en la figura 26
(Conexiones NE SAL vs E SAL)

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
ACAT2	acetyl-CoA acetyltransferase 2
AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1
AK2	adenylate kinase 2
ALDOA	fructosa-bifosfato aldolasa A
ATP5A1	ATP-sintasa, subunidad α
ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit s (factor B)
ATP6V1E1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1
ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1
ATPAF2	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2
CBR1	carbonyl reductase 1
CNP	2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa
DPYSL2	Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2
ENO1	enolase 1, (alpha)
FH	fumarate hydratase
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GSTO1	glutathione S-transferase omega 1
LDHB	lactate dehydrogenase B
MAP2K1	Quinasa 1 de la proteinquinasa activada por mitógeno
MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
MT-ND3	NADH dehydrogenase, subunit 3 (complex I)
NDUFA9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9, 39kDa
NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NDUFS4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NDUFV2	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona], flavoproteína 2
PGAM2	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
PKM2	pyruvate kinase, muscle
SYN2	sinapsina II
TKT	transketolase
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
VDAC1	canal aniónico dependiente de voltaje, isoforma 1
VDAC2	voltage-dependent anion channel 2
ZNF224	zinc finger protein 224

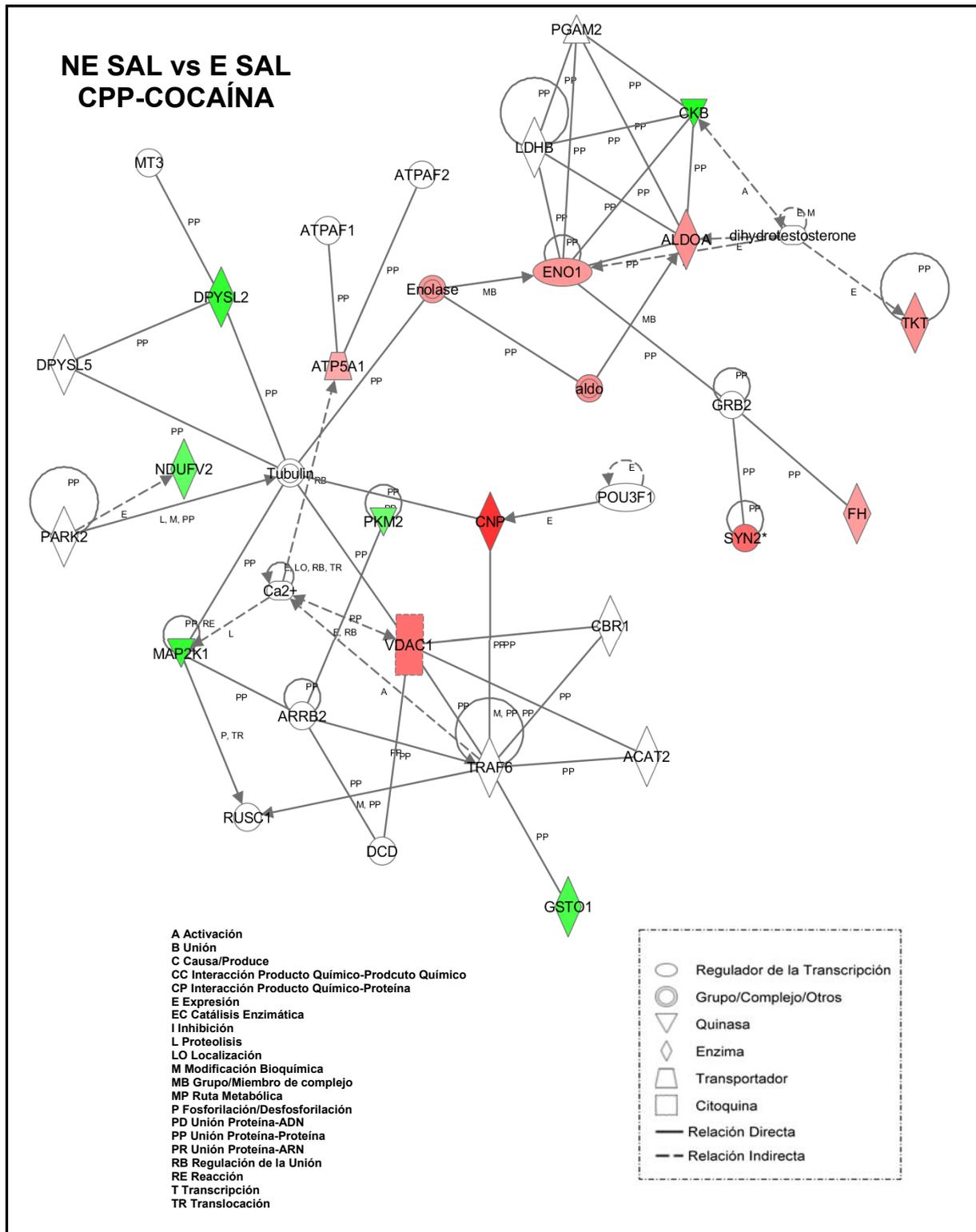


Figura 26: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación NE SAL vs E SAL del CPP de cocaína. Las moléculas marcadas en verde presentaron mayor expresión en el grupo NE SAL y las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en el grupo E SAL. La intensidad del color de las proteínas indica en grado de regulación. Las proteínas en blanco no se detectaron en nuestro estudio. Las abreviaturas de los nombres de las proteínas de la figura se detallan en la página anterior.

Abreviaturas de las proteínas incluidas en la figura 27**(Conexiones NE COC vs E COC)**

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
ACO1	aconitase 1, soluble
ACO2	aconitato hidratasa
ANXA11	annexin A11
ASB9	ankyrin repeat and SOCS box-containing 9
ATP5A1	ATP-sintasa, subunidad α
ATP5F1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1
ATP5H	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d
ATP5I	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E
ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit s (factor B)
DLST	dihidrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)
ENO2	γ -enolasa
HERC6	hect domain and RLD 6
HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc
HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be
HNRNPH2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')
HSPD1	proteína de choque térmico de 60 kDa, (HSP-60)
IFNG	interferon, gamma
IL17B	interleukin 17B
IL2	interleukin 2
IREB2	iron-responsive element binding protein 2
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NDUFA10	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona], 1- α
NME2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in
OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
PRDX5	peroxirredoxina 5
PRL	prolactin
RPL38	ribosomal protein L38
SPN	sialophorin
SUCLA2	succinato-CoA sintetasa, subunidad β - oxoglutarato deshidrogenasa
TST	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)
UMPS	uridine monophosphate synthetase
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor

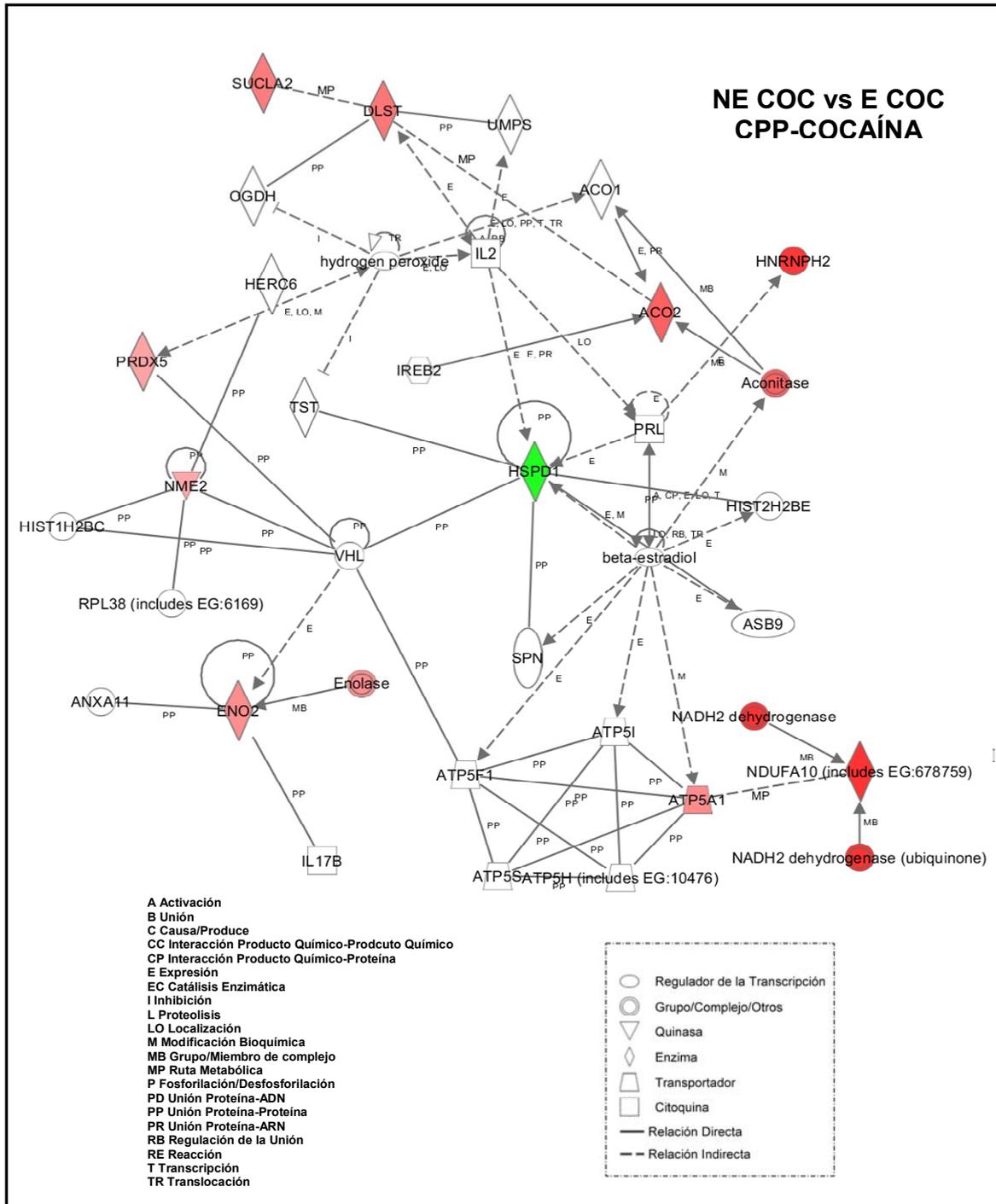


Figura 27: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación NE COC vs E COC del CPP de cocaína. Las moléculas marcadas en verde presentaron mayor expresión en el grupo NE COC y las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en el grupo E COC. La intensidad del color de las proteínas indica en grado de regulación. Las proteínas en blanco no se detectaron en nuestro estudio. Las abreviaturas de los nombres de las proteínas de la figura se detallan en la página anterior.

3.2. Análisis proteómico de núcleos cerebrales de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.

Tras la extracción de los núcleos cerebrales de interés (NAcc y CPF) de los animales que se habían seleccionado en los ensayos de comportamiento con morfina, se procedió al análisis proteómico de dichos núcleos mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas.

Como se ha comentado en el capítulo “Material y Métodos” los grupos experimentales y las comparaciones establecidas fueron las siguientes:

a) E SAL vs NE SAL: Esta comparación permite estudiar las diferencias en la expresión proteica a nivel basal en animales que muestran distinta vulnerabilidad a los efectos adictivos de la morfina.

b) E MOR vs NE MOR: Esta comparación permite el estudio de las diferencias en la expresión proteica derivadas de la administración aguda de morfina en animales con distinta vulnerabilidad a los efectos de dicha droga.

c) E SAL vs E MOR y NE SAL vs NE MOR: Estas comparaciones se establecieron con el fin de observar los cambios en la expresión proteica inducidos por la administración aguda de morfina.

Las comparaciones de los apartados a) y b) permiten caracterizar perfiles de expresión proteica que podrían funcionar como marcadores directos de vulnerabilidad, bien previos al consumo de la droga o bien posteriores al mismo. Por ello, los resultados obtenidos de dichas comparaciones se discutirán con más detalle.

3.2.1. Análisis proteómico del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.

Después de la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional, y tras su tinción con nitrato de plata, se obtuvieron geles en los que se pueden observar una serie de puntos que corresponden al mapa proteico del NAcc de los animales seleccionados (ver un ejemplo en la figura 28). Para la detección, emparejamiento y análisis de la densidad óptica de los puntos se utilizó el programa PD-Quest 8.0.1. La

tabla 21 muestra la media del número de puntos detectados para cada grupo experimental.

Tabla 21: Puntos detectados en los geles bidimensionales obtenidos de los NAcc procedentes de animales del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina E SAL: Extingue + Salino; E MOR: Extingue + Morfina; NE SAL: No Extingue + Salino; NE MOR: No Extingue + Morfina. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M.

GRUPO	n	Puntos detectados
E SAL	6	1106 \pm 96,4
E MOR	6	1147 \pm 102,9
NE SAL	6	1272 \pm 92,6
NE MOR	6	1053 \pm 78,8

En la tabla 22 se muestran todas las proteínas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones realizadas

Tabla 22: Proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de la densidad óptica (D.O.) normalizada de cada proteína. E SAL: grupo Extingue + Salino; E MOR: grupo Extingue + Morfina; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE MOR: grupo No Extingue + Morfina. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL; n.d.: proteína no detectada.(n=6)

Nº Punto	CPP MORFINA-NAcc			
	D.O. Normalizada			
	E SAL	E MOR	NE SAL	NE MOR
N-0016	8,13 \pm 3,04	17,93 \pm 6,27	23,45 \pm 3,18*	18,72 \pm 2,55
N-0021	33,98 \pm 13,81	20,30 \pm 12,91	37,90 \pm 4,45	16,52 \pm 5,27 [#]
N-1005	7,88 \pm 5,65	20,58 \pm 7,16	30,22 \pm 6,07*	21,20 \pm 4,30
N-1102	3,18 \pm 2,03	11,00 \pm 3,95	18,50 \pm 2,41*	9,70 \pm 1,21 [#]
N-1109	6,33 \pm 2,13	40,73 \pm 13,28 [#]	31,02 \pm 9,33*	35,10 \pm 9,63
N-1606	0,33 \pm 0,33	1,93 \pm 1,50	5,53 \pm 0,92*	3,18 \pm 1,13
N-1607	2,47 \pm 1,31	7,82 \pm 3,22	10,00 \pm 2,00*	3,73 \pm 1,51 [#]
N-1710	0,68 \pm 0,68	4,03 \pm 2,90	4,57 \pm 1,33*	10,78 \pm 8,97
N-1911	0,63 \pm 0,63	0,47 \pm 0,47	3,90 \pm 0,27*	5,02 \pm 3,27
N-1915	7,98 \pm 1,85	10,67 \pm 2,18	15,68 \pm 1,71*	9,40 \pm 1,68 [#]
N-2009	0,85 \pm 0,85	5,05 \pm 3,25	5,60 \pm 1,74*	3,15 \pm 1,42
N-2201	2,95 \pm 1,18	5,58 \pm 1,22	8,50 \pm 1,98*	6,68 \pm 1,57
N-2613	2,65 \pm 1,17	7,28 \pm 1,47 [#]	3,97 \pm 0,96	4,53 \pm 1,94
N-2907	1,70 \pm 1,10	2,32 \pm 1,16	6,87 \pm 1,37*	5,77 \pm 1,30
N-3305	2,48 \pm 1,25	4,92 \pm 2,76	3,32 \pm 1,57	8,65 \pm 1,25 [#]
N-3309	23,43 \pm 5,26	14,90 \pm 5,66	18,65 \pm 2,41	29,97 \pm 3,78 [#]
N-3802	0,25 \pm 0,25	0,72 \pm 0,72	1,35 \pm 0,38*	0,45 \pm 0,28
N-4210	9,55 \pm 3,67	4,80 \pm 1,90	10,13 \pm 1,01	5,18 \pm 1,30 [#]
N-4413	19,93 \pm 2,79	11,60 \pm 1,93 [#]	1,52 \pm 1,52*	3,82 \pm 1,44*
N-4612	9,60 \pm 3,57	17,12 \pm 5,56	4,08 \pm 1,15	2,58 \pm 1,15*
N-4901	0,88 \pm 0,40	0,77 \pm 0,50	2,43 \pm 0,51*	1,52 \pm 0,36
N-4905	3,38 \pm 0,99	3,55 \pm 1,02	5,00 \pm 0,44	1,43 \pm 0,91 [#]
N-5007	0,98 \pm 0,70	1,23 \pm 0,50	3,90 \pm 1,00*	3,12 \pm 1,63
N-5711	8,42 \pm 2,21	12,53 \pm 1,86	10,42 \pm 2,35	6,50 \pm 1,05*

Tabla 22: Continuación

CPP MORFINA-NAcc (Continuación)				
D.O. Normalizada				
Nº Punto	E SAL	E MOR	NE SAL	NE MOR
N-5713	8,00 ± 2,88	7,87 ± 1,98	9,47 ± 1,09	4,87 ± 1,23 [#]
N-5715	8,27 ± 2,03	9,78 ± 1,04	6,72 ± 1,28	4,23 ± 0,63*
N-5801	4,85 ± 1,65	4,25 ± 0,51	4,72 ± 1,89	1,67 ± 0,75*
N-5902	6,45 ± 3,73	4,08 ± 1,87	5,93 ± 1,03	3,28 ± 0,57 [#]
N-5904	7,47 ± 2,32	7,15 ± 1,25	4,28 ± 1,18	2,82 ± 0,67*
N-6204	1,43 ± 0,92	n.d.	1,70 ± 1,13	5,88 ± 1,22 [#]
N-6210	33,97 ± 4,13	50,40 ± 5,94 [#]	25,88 ± 4,75	24,92 ± 4,17*
N-6212	3,37 ± 1,40	3,88 ± 1,50	8,33 ± 0,82*	4,98 ± 1,68
N-6301	59,62 ± 7,21	65,57 ± 5,03	46,27 ± 9,09	47,73 ± 5,66*
N-6304	101,20 ± 4,48	111,10 ± 9,87	79,08 ± 9,31	109,20 ± 5,99 [#]
N-6403	6,03 ± 0,71	7,32 ± 0,29	4,18 ± 0,67	4,72 ± 0,60*
N-6508	28,82 ± 2,50	23,70 ± 2,98	21,95 ± 1,49*	28,77 ± 3,67
N-6611	22,98 ± 4,14	13,85 ± 3,19	7,00 ± 1,16*	6,75 ± 0,84
N-6613	7,75 ± 7,75	37,83 ± 13,96	16,57 ± 6,77	40,83 ± 8,35 [#]
N-6707	6,63 ± 0,94	8,75 ± 1,16	6,18 ± 2,05	4,72 ± 0,53*
N-7107	75,95 ± 9,34	70,68 ± 7,67	52,08 ± 3,73*	61,02 ± 5,88
N-7205	46,47 ± 3,78	33,77 ± 10,42	28,45 ± 1,56*	11,55 ± 3,94 [#]
N-7208	99,48 ± 8,25	120,10 ± 12,55	86,88 ± 5,59	74,92 ± 9,30*
N-7210	7,97 ± 2,18	6,80 ± 2,57	2,47 ± 0,66*	1,48 ± 1,22
N-7511	33,47 ± 10,52	40,70 ± 13,81	68,45 ± 11,21*	30,87 ± 7,18 [#]
N-7902	2,02 ± 0,70	2,10 ± 0,13	1,98 ± 0,49	3,03 ± 0,17*
N-8003	219,50 ± 13,42	192,30 ± 19,74	141,60 ± 24,58*	139,60 ± 34,45
N-8007	20,55 ± 3,61	24,22 ± 8,70	13,98 ± 1,60	21,03 ± 0,91 [#]
N-8008	23,30 ± 3,29	18,97 ± 4,37	9,10 ± 1,97*	14,20 ± 3,26
N-8102	44,52 ± 6,26	42,50 ± 6,64	30,35 ± 2,45	40,22 ± 2,82 [#]
N-8103	16,13 ± 3,16	13,05 ± 2,97	4,03 ± 1,16*	12,28 ± 2,39 [#]
N-8116	115,80 ± 5,69	98,43 ± 18,19	76,42 ± 15,42*	107,0 ± 10,87
N-8120	60,35 ± 7,25	25,17 ± 16,02	29,60 ± 7,18*	59,73 ± 15,29
N-8204	6,80 ± 1,33	6,20 ± 1,63	3,23 ± 0,83*	2,78 ± 1,07
N-8304	81,13 ± 9,82	71,90 ± 9,85	46,88 ± 6,31*	54,43 ± 4,77

Tabla 22: Continuación

	CPP MORFINA-NAcc (Continuación)			
	D.O. Normalizada			
Nº Punto	E SAL	E MOR	NE SAL	NE MOR
N-8405	37,62 ± 6,10	27,08 ± 4,06	19,63 ± 1,51*	19,57 ± 1,78
N-8513	8,22 ± 1,33	5,72 ± 1,43	2,60 ± 0,83*	2,82 ± 1,19
N-8604	11,13 ± 2,74	9,18 ± 1,99	5,30 ± 1,24	10,23 ± 0,86 [#]
N-9102	35,53 ± 4,20	22,58 ± 5,93	22,13 ± 4,94	38,37 ± 4,35 [#]

En la figura 28 se muestra un gel representativo de las proteínas extraídas de NAcc. En dicho gel se han marcado las proteínas que mostraron diferencias significativas en las comparaciones anteriormente detalladas.

De entre todas las proteínas cuya densidad óptica varió significativamente, se seleccionaron aquellas en las que la variación de la densidad óptica fue al menos 1,5 veces superior al comparar un grupo con otro. En total se seleccionaron 44 proteínas. Finalmente se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 23 proteínas. Dichas proteínas se han señalado en color verde en el gel de la figura 28. Los datos de espectrometría de masas que sirvieron para la identificación de dichas proteínas se muestran en la tabla 23. En la figura 29 se representa gráficamente la densidad óptica de las proteínas identificadas.

A modo de resumen, en la tabla 24 se recogen las proteínas identificadas, indicando las comparaciones en las que mostraron diferencias significativas y, en esos casos, el ratio de variación

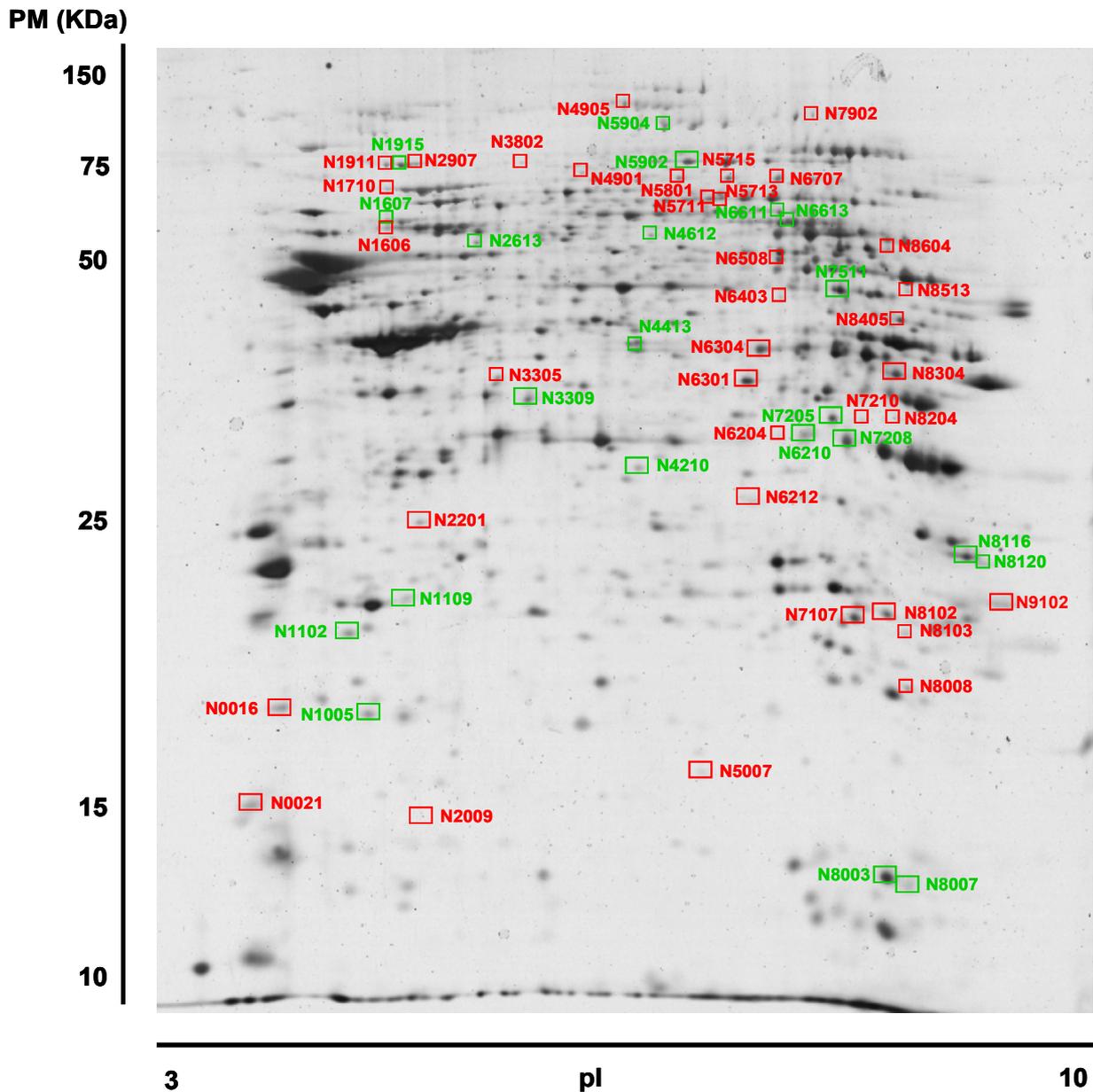


Figura 28: Gel bidimensional representativo de las proteínas de NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina. Las proteínas marcadas mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos y las señaladas en color verde se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 23: Proteínas identificadas por espectrometría de masas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. PM: Peso molecular; pl: Punto isoeléctrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados
N-1005	Peroxisredoxina-2 (PRDX-2)	P35704	21941	5,34	178	66	15(65)
N-1102	Inhibidor 1 de disociación Rho GDP	Q5X173	23450	5,12	157	70	19(65)
N-1109	Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa, isoforma 1 (UCHL1)	Q00981	25165	5,14	66	43	8(54)
N-1607	α -internexina	P23565	56253	5,20	432	60	40(65)
N-1915	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 1	Q66HF1	80331	5,65	126	29	20(65)
N-2613	Proteína relacionada con la dihidropirimidinas-2	P47942	62638	5,95	168	49	22(65)
N-3309	Subunidad α de la isocitrato deshidrogenasa [NAD]	Q99NA5	40044	6,47	186	46	22(65)
N-4210	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD ⁺] citoplásmica	O35077	38112	6,16	80	42	10(65)
N-4413	Adenosilhomocisteinasa	P10760	48020	6,07	74	28	11(65)
N-4612	Mezcla (Proteína asociada a la adenilil ciclasa-2/ Proteína de unión a syntaxina-1)	P52481/ P61765	53164/ 67925	6,69/ 6,49	122/ 120	28/34	18(65)/ 22(65)
N-5902	ATPasa de fusión de vesículas	Q9QUL6	83170	6,55	337	48	41(61)
N-5904	Dinamina-1	P21575	97576	6,44	182	32	28(64)
N-6210	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	P04797	36090	8,14	124	45	14(46)
N-6611	Proteína de unión a syntaxina-1	P61765	67925	6,49	76	29	16(65)
N-6613	Mezcla (Isoenzimas M1/M2 de la piruvato quinasa/ Proteína relacionada con la dihidropirimidinas-5)	P11980/ Q9JHU0	58294/ 62071	6,63/ 6,60	310/ 65	69/ 31	37(85)/ 12(85)
N-7205	Mezcla (Deacetilasa sirtuina NAD-dependiente-2 / Fosfodiesterasa 3' de nucleótidos 2',3'-cíclicos)	Q5RJQ4/ P13233	39921/ 47638	6,67/ 9,03	174/ 95	46/ 29	18(54)/ 13(54)
N-7208	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	P04797	36090	8,14	158	53	19(65)
N-7511	4-aminobutirato aminotransferasa mitocondrial	P50554	57161	8,15	97	32	12(47)
N-8003	Cofilina-1	P45592	18749	8,22	157	87	18(65)
N-8007	Proteína de mielina básica S	P02688	21546	11,25	102	55	12(65)
N-8008	Peroxisredoxina-1	Q63716	22323	8,27	143	56	13(50)
N-8116	Subunidad γ de ATP sintasa mitocondrial	P35435	30229	8,87	92	39	14(52)
N-8120	Subunidad δ de ATP sintasa mitocondrial	P35435	30229	8,87	73	37	12 (65)

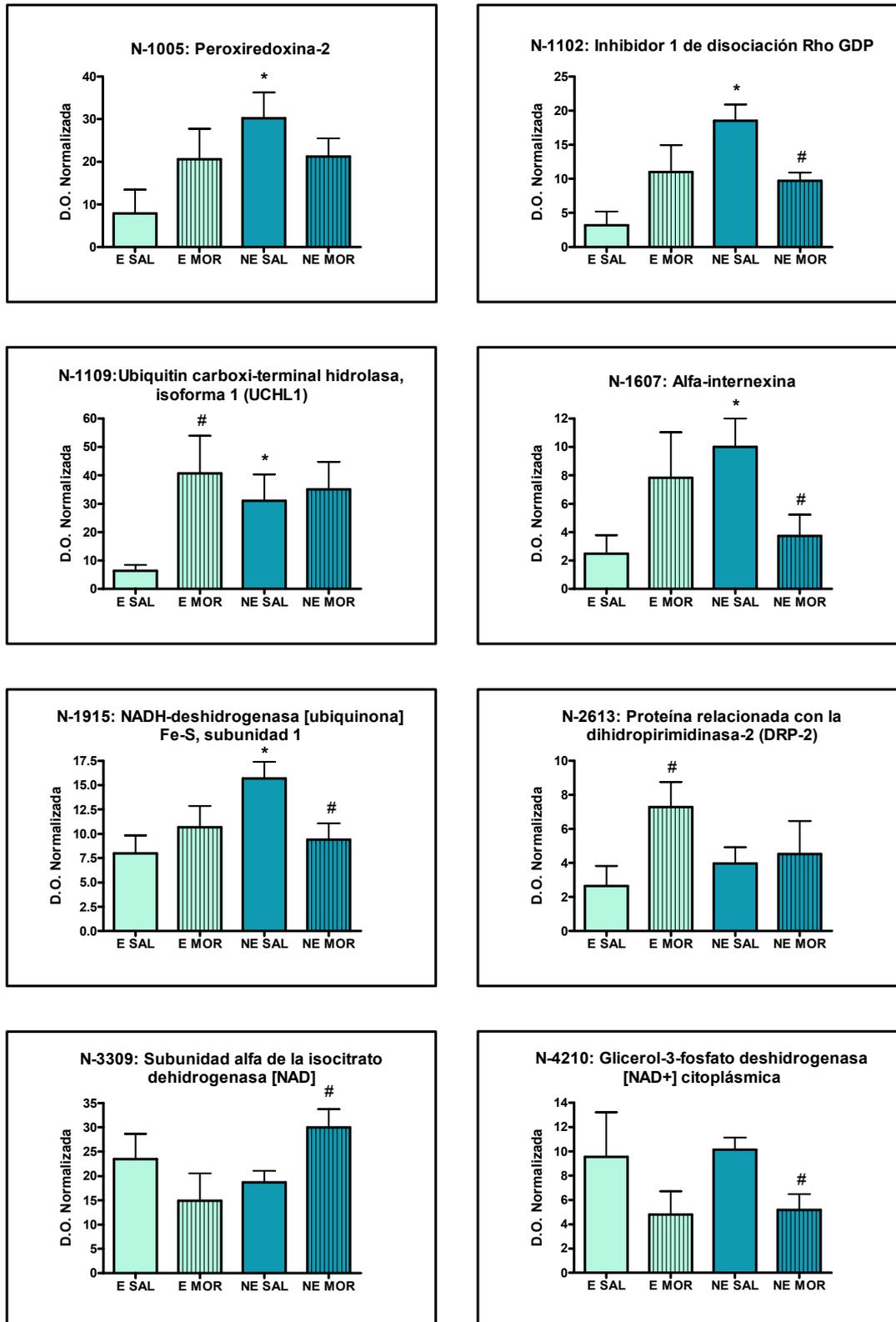


Figura 29: Expresión de las proteínas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por morfina identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D.O.) normalizada \pm E.S.M. E SAL: grupo Extingue + Salino; E MOR: grupo Extingue + Morfina; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE MOR: grupo No Extingue + Morfina. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL (n=6).

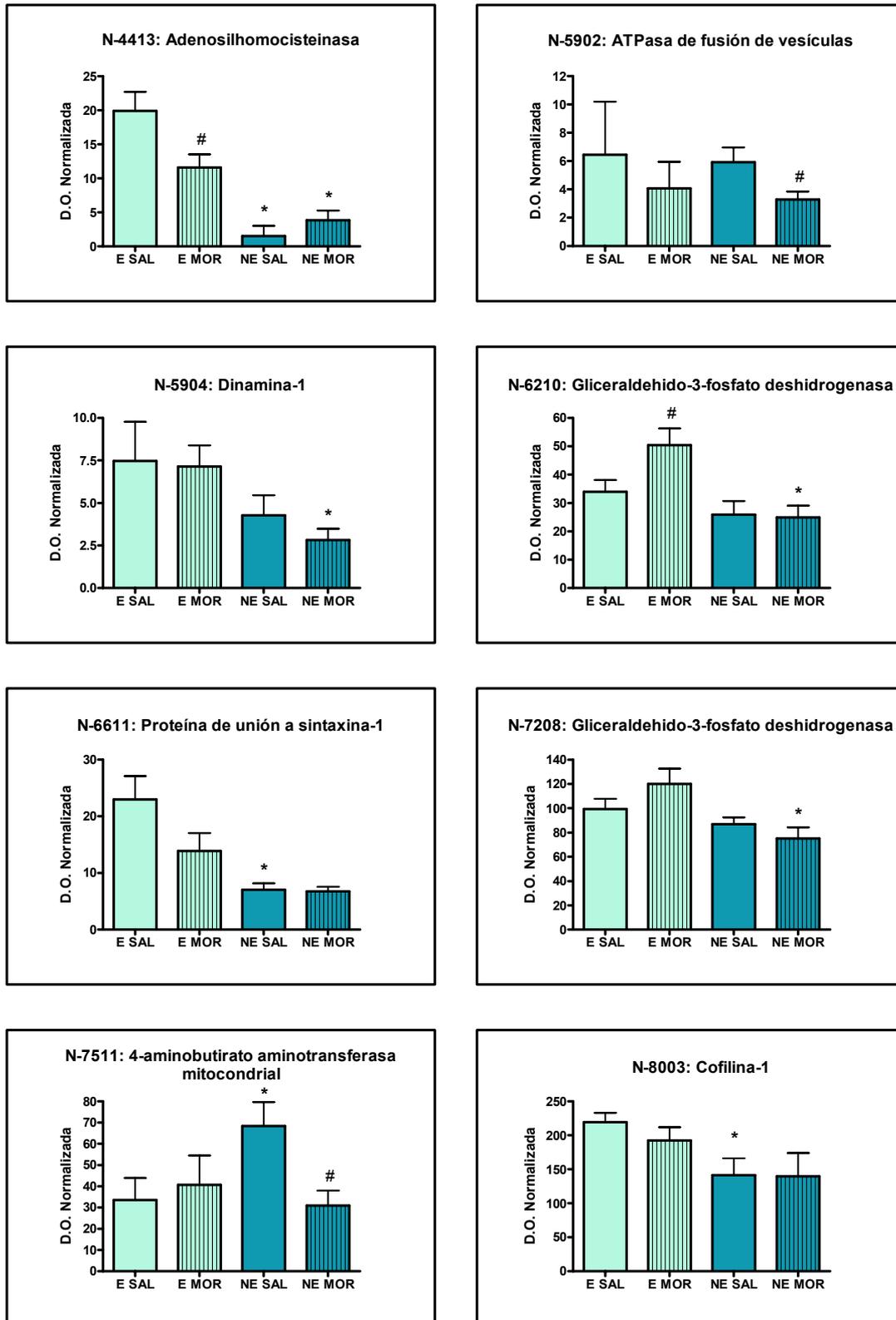


Figura 29: Continuación.

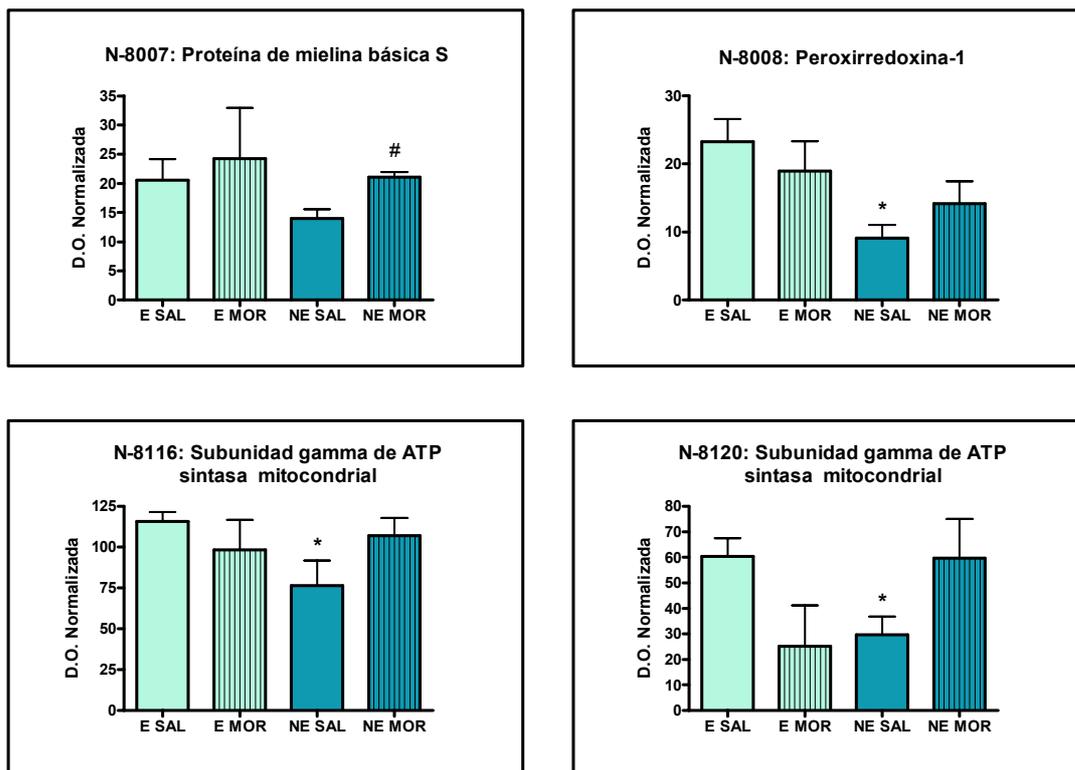


Figura 29: Continuación.

Tabla 24: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas del NAcc de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. E SAL: grupo Extingue + Salino; E MOR: grupo Extingue + Morfina; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE MOR: grupo No Extingue + Morfina. n.s. diferencia no significativa en la comparación de estos grupos.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Ratio densidades ópticas normalizadas			
		NE SAL/ E SAL	NE MOR/ E MOR	E MOR/ E SAL	NE MOR/ NE SAL
N-1005	Peroxiredoxina-2 (PRDX-2)	3,84	n.s.	n.s.	n.s.
N-1102	Inhibidor 1 de disociación Rho GDP	5,82	n.s.	n.s.	0,52
N-1109	Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa, isoforma 1 (UCHL1)	4,90	n.s.	6,43	n.s.
N-1607	α -internexina	4,05	n.s.	n.s.	0,37
N-1915	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 1	1,96	n.s.	n.s.	0,60
N-2613	Proteína relacionada con la dihidropirimidinasa-2 (DRP-2)	n.s.	n.s.	2,75	n.s.
N-3309	Subunidad α de la isocitrato deshidrogenasa [NAD]	n.s.	n.s.	n.s.	1,61
N-4210	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD ⁺] citoplásmica	n.s.	n.s.	n.s.	0,51
N-4413	Adenosilhomocisteinasa	0,08	0,34	0,58	n.s.
N-5902	ATPasa de fusión de vesículas	n.s.	n.s.	n.s.	0,55
N-5904	Dinamina-1	n.s.	0,39	n.s.	n.s.
N-6210	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	n.s.	0,49	1,48	n.s.
N-6611	Proteína de unión a syntaxina-1	0,30	n.s.	n.s.	n.s.
N-7208	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	n.s.	0,62	n.s.	n.s.
N-7511	4-aminobutirato aminotransferasa mitocondrial	2,04	n.s.	n.s.	0,45.
N-8003	Cofilina-1	0,65	n.s.	n.s.	n.s.
N-8007	Proteína de mielina básica S	n.s.	n.s.	n.s.	1,5
N-8008	Peroxirredoxina-1	0,39	n.s.	n.s.	n.s.
N-8116	Subunidad γ de ATP sintasa mitocondrial	0,66	n.s.	n.s.	n.s.
N-8120	Subunidad γ de ATP sintasa mitocondrial	0,49	n.s.	n.s.	n.s.

Para validar los datos de expresión proteica obtenidos en análisis proteómico del NAcc se analizó mediante Western-Blot la expresión de una de las proteínas en las que se obtuvieron variaciones significativas en los ensayos de electroforesis bidimensional. Para ello se eligió la proteína PRDX-2 ya que un gran número de proteínas de la familia a la que pertenece esta proteína están reguladas por la acción de las drogas de abuso (Li y Wang, 2007, Tannu y col., 2007; Witzmann y col., 2003). Además, esta proteína mostró diferencias significativas en su expresión tanto en el ensayo realizado con el NAcc del CPP de cocaína como en el presente estudio. En concreto en este estudio se detectaron variaciones significativas en la expresión de la PRDX-2 al comparar los animales NE SAL con los E SAL (figura 29, N-1005). Los ensayos de Western-Blot confirmaron dicho resultado (tabla 25, figura 30).

Tabla 25: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de PRDX-2 en el NAcc de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del ratio de las densidades ópticas de la proteína PRDX-2 y β -actina (PRDX-2/ β -actina). E SAL: grupo Extingue + Salino; NE SAL: grupo No Extingue + Salino, (* $p < 0,05$ vs E SAL, $n=6$).

GRUPO	RATIO DENSIDADES ÓPTICAS PDRX-2/ β -ACTINA (u.a)
E SAL	0.4950 \pm 0.0146
NE SAL	0.8533 \pm 0.0555*

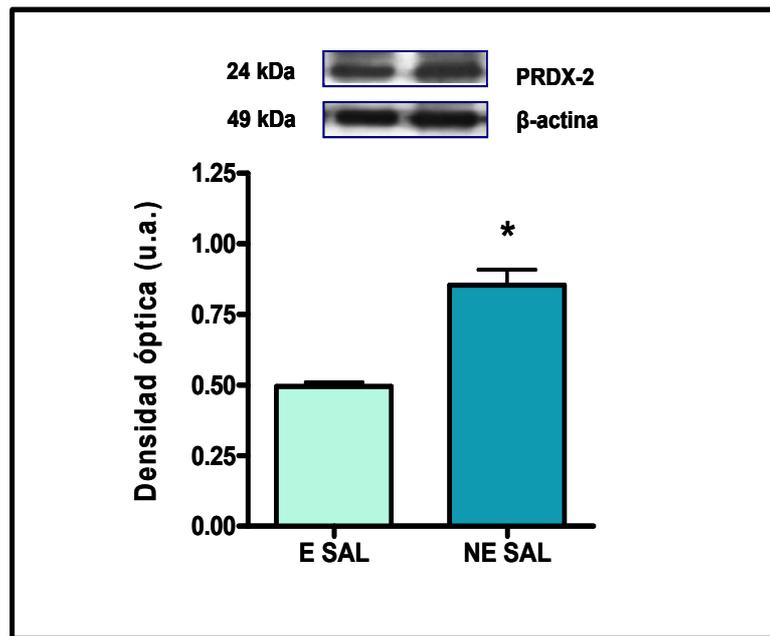


Figura 30: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de PRDX-2 en el NAcc de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. Las barras representan la media \pm ESM de la densidad óptica. * $p < 0,05$ respecto a la densidad óptica del grupo E SAL. En la parte superior se muestra un ejemplo representativo del marcaje de la PRDX-2 y de la β -actina, que se utilizó como control de carga. E SAL: grupo Extingue + Salino, n=6; NE SAL: grupo No Extingue + Salino, n=6.

Como se ha explicado anteriormente, para obtener información sobre qué proteínas podían ser responsables de las diferencias en la velocidad de extinción de los animales obtenidos en el ensayo de CPP, se realizó una comparación de los proteomas del NAcc de los animales de los grupos **E SAL** y **NE SAL** y se encontraron diferencias significativas en la expresión de varias proteínas, de las cuales se identificaron 11 de ellas (figura 29). La mayoría participan en procesos relacionados con la comunicación y el ensamblaje celular y son: el inhibidor 1 de disociación Rho-GDP, la isoforma L1 de la ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa (UCHL1), la α -internexina, la proteína de unión a la sintaxina-1 y la cofilina-1. El resto son proteínas que participan en la degradación de radicales libres (peroxirredoxina-2 (PRDX-2) y peroxirredoxina-1) y en la fosforilación oxidativa (subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad γ y de la ATP sintasa mitocondrial. Además también se detectaron variaciones significativas en la adenosilhomocisteinasa y en la 4-aminobutirato aminotransferasa. La subunidad γ y de la ATP sintasa mitocondrial se detectó en dos de los puntos analizados, lo cual puede ser debido

a modificaciones post-trasduccionales, sin embargo, el patrón de expresión fue idéntico en ambos puntos (figura 29; N-8116 y N-8120).

Los animales que no extinguieron la preferencia por morfina mostraron también una mayor expresión del inhibidor 1 de disociación Rho-GDP (figura 29, N-1102). En el estriado de ratas tratadas de forma aguda con metaanfetamina también se han detectado alteraciones en la expresión de esta enzima (Iwazaki y col., 2006). Los inhibidores de disociación Rho-GDP mantienen a las proteínas Rho en su estado inactivo impidiendo que intercambien GDP por GTP (DerMardirossian y Bokoch, 2005). En las células de mamíferos las proteínas Rho (RhoA, Cdc42 y Rac) están activadas por señales extracelulares específicas y participan en la organización de la actina del citoesqueleto, en el crecimiento y diferenciación celular, en el control de la producción de radicales libres y en la transcripción génica (Van Aelst y Souza-Schorey, 1997; Bishop y Hall, 2000).

La UCHL1 pertenece a la familia de las enzimas desubiquitinizantes, que son proteasas que, rompen las uniones que la ubiquitina forma con otras proteínas, de esta forma se recicla la ubiquitina y se desubiquitinizan proteínas que habían sido incorrectamente marcadas con ubiquitina (Reyes-Turcu y col., 2009). La ubiquitina marca proteínas anómalas o dañadas para que sean destruidas por el proteasoma. Sin embargo, el sistema ubiquitina-proteasoma no sólo está relacionado con la degradación de proteínas anómalas, sino que también está involucrado en procesos tan diversos como el control del ciclo celular, el tráfico de proteínas, la biogénesis de orgánulos, el control de la transcripción, la transducción de señales o la plasticidad neuronal (Murphey y Godenschwege, 2002). Por lo que, si bien de forma indirecta, la UCHL1 también podría participar en estos procesos; de hecho se ha descrito alteraciones de la UCHL1 en varias enfermedades neurodegenerativas (Xue y Jia, 2006; Das y col., 2006). También se pueden encontrar datos en la bibliografía que relacionan la UCHL1 con la exposición a drogas de abuso como el alcohol, la nicotina, o la metanfetamina (Li y Wang, 2007). En el caso concreto de la morfina, se ha descrito que este opiáceo disminuye la expresión de la UCHL1 en el NAcc de ratas tratadas durante 14 días con morfina (Li y col., 2006). En nuestros resultados podemos observar que la expresión de esta proteína es significativamente menor en el grupo E SAL cuando se compara con NE SAL y que la administración de morfina produce un aumento en los niveles de expresión de los animales que habían extinguido la conducta de búsqueda, quedando igualada dicha expresión con la de los animales que no extinguieron la preferencia por la droga (figura

29, N-1109). Este hecho podría hacer pensar que quizás la nueva administración del opiáceo reactivaría la conducta de búsqueda de la droga en los animales que ya la habían extinguido. A la vista de estos resultados y de los obtenidos tras la búsqueda bibliográfica, podríamos concluir que la proteína UCHL1 podría ser un buen marcador de vulnerabilidad a la dependencia a morfina y que sus niveles de expresión estarían directamente relacionados con la tendencia a la recaída en la conducta adictiva.

La α -internexina pertenece a la clase IV de los filamentos intermedios. En los primeros estadios del desarrollo neuronal, es capaz de formar por si sola una red estructural en la neurona; pero también puede cooperar con los neurofilamentos de bajo peso molecular para formar un soporte sobre el cual se ensamblan posteriormente los neurofilamentos de medio y alto peso molecular. (Levasseur y col., 1999). Se ha descrito que esta proteína está implicada en varias enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, la demencia o el Parkinson (Lariviere y Julien, 2004). Además, recientes estudios revelan una disminución de los niveles de esta proteína en la corteza frontal de pacientes con encefalopatía de Wernicke (Hazell y col., 2010). Esta enfermedad esta causada por un déficit de vitamina B1 o tiamina, que se presenta normalmente en personas con alcoholismo crónico. En nuestros resultados se puede observar que esta proteína se encuentra aumentada significativamente en el grupo NE SAL cuando se compara con E SAL (figura 29, N-1607).

La proteína de unión a la syntaxina 1 modula la liberación de neurotransmisores regulando la fusión y unión de las vesículas que los almacenan (Rettig y Neher, 2002). En los animales del grupo NE SAL se detectaron menores niveles de esta proteína que en los del grupo E SAL (figura 29, N-6611). Otros autores también han detectado variaciones en la expresión de esta proteína en el cerebro de ratas tratadas con morfina (Prokay col., 2005; Moron y col., 2007). Además, nuestros resultados estarían también en consonancia con la disminución de esta proteína detectada en el cerebro de ratas tratadas de forma continua durante 7 días con alcohol (Bell y col., 2006).

La familia de las cofilinas controlan de forma reversible la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina (Cooper y Hausman, 2004). En estudios realizados en NAcc de ratas con un periodo de abstinencia de tres semanas tras un consumo continuado de cocaína, se ha observado un aumento de la despolimerización de la actina como consecuencia de la reducción de la expresión de la cofilina (Toda y col., 2006) En nuestros resultados se observa un cierto paralelismo con los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica, ya que el grupo de animales NE SAL muestran

unos niveles de expresión de cofilina-1 significativamente superiores a los del grupo E SAL.

En apartados previos de esta memoria se ha comentado la función de las proteínas de la familia de las peroxirredoxinas y cómo la exposición a drogas de abuso modifica su expresión. Dichos datos unidos a las variaciones en la expresión de PRDX-2 y peroxirredoxina-1 detectadas en el presente estudio, apoyarían la implicación de estas isoformas en la distinta vulnerabilidad a los efectos de la morfina. El hecho de que las variaciones detectadas al comparar la expresión de dichas proteínas en los grupos NE SAL y ESAL se produzcan en sentido contrario (la expresión aumenta en la PRDX-2 y disminuye en la peroxirredoxina-1; figura 29; N-1005, N-8008) puede deberse a las diferencias en algunas de las funciones de estas enzimas. Así, mientras que la PRDX-2 interviene fundamentalmente en la protección frente al ataque de radicales libres (Kim y col., 2000), la peroxirredoxina-1 interviene además en procesos fisiológicos, como la proliferación y diferenciación celular (Fuji y Ikeda, 2002).

La subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, es una subunidad de la NADH ubiquinona oxidorreductasa perteneciente al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Talpade y col., 2000). La subunidad γ de la ATP sintasa es otra enzima mitocondrial que participa junto a la anterior en la fosforilación oxidativa (Lee y col., 1990). En apartados anteriores de esta Tesis se ha detallado la alteración que las drogas de abuso, como la morfina, producen en la expresión de estas enzimas. En el presente estudio se detectó al comparar el grupo NE SAL con el E SAL un aumento significativo de la subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S y una disminución en la expresión de la subunidad γ de la ATP sintasa, (figura 29; N-1915 y N-5902), lo cual indicaría, una vez más, que estas proteínas influyen en la susceptibilidad a los efectos adictivos de las drogas de abuso.

La enzima 4-aminobutirato aminotransferasa o GABA transaminasa; cataliza la conversión del GABA y del 2-oxoglutarato en semialdehído succínico y glutamato. Como se ha detallado en la Introducción, el refuerzo producido por los opiáceos implica la inhibición de la liberación del GABA (Di Chiara y col., 2004); y, por otro lado, la activación de los receptores de glutamato del NAcc es necesaria para el mantenimiento de la conducta de búsqueda de la droga (Di Ciano y Everitt, 2001; Backstrom y Hyytia, 2007). Por lo que en los animales NE SAL, la elevada expresión de la GABA transaminasa (figura 29, N-7511) se traduciría en bajos niveles de GABA y altos niveles de glutamato,

lo cual, según los datos bibliográficos aumentaría en estos animales en refuerzo producido por la morfina y retrasaría la extinción de la preferencia por la droga.

La adenosilhomocisteinasa cataliza la hidrólisis de adenosilhomocisteína para producir adenosina y homocisteína (Castro y col., 2005). La adenosilhomocisteína compete con la S-adenosil-metionina por la enzima metil-transferasa, reduciendo por tanto las reacciones de metilación, que son cruciales en la síntesis y el metabolismo de monoaminas (Castro y col., 2005). Por tanto, la adenosilhomocisteinasa puede regular de forma indirecta las reacciones de metilación, y por ende el metabolismo de monoaminas, a través de la regulación de los niveles de adenosilhomocisteína. La relación que este hecho pueda tener con el mantenimiento de la conducta de búsqueda de morfina es difícil de dilucidar, y en la literatura tampoco hemos encontrado datos que relacionen esta enzima con el consumo de drogas. No obstante, el hecho de que en nuestro estudio se detecte una disminución significativa en la expresión de esta enzima en los dos grupos de animales que no extinguieron la preferencia por morfina (figura 29, N-4413) podría indicar que la adenosilhomocisteinasa podría ser un buen marcador de vulnerabilidad diferencial a la adicción a morfina.

Es interesante comentar que la expresión de 3 de las proteínas anteriormente mencionadas: inhibidor 1 de disociación Rho-GDP, subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S y 4-aminobutirato aminotransferasa, se redujo significativamente en el grupo NE MOR con respecto al NE SAL hasta alcanzar valores similares a los de los animales que extinguieron la preferencia por la droga. Estos resultados podrían indicar que la administración de una nueva dosis del opiáceo podría revertir algunas de las alteraciones proteómicas de los animales que no extinguieron la preferencia por la droga. Este patrón de cambios podría indicar un estado de dependencia física. Por lo que, podría concluirse que el incremento en la expresión de dichas proteínas podría contribuir a la aparición del síndrome de abstinencia y, en consecuencia, al mantenimiento de la conducta de búsqueda de la droga.

Por otro lado, con la comparación de los grupos **E MOR y NE MOR** se pretendió observar si el patrón de cambio de las proteínas inducido por el consumo agudo de la droga es diferente en animales con distinta vulnerabilidad a la adicción a morfina. En este caso se consiguió identificar 3 proteínas, cuyos niveles de expresión eran mayores en el grupo E MOR: la dinamina-1, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y la adenosilhomocisteinasa (figura 29); en esta última, como se ha comentado

anteriormente, también se detectaron variaciones significativas en la comparación NE SAL vs E SAL.

La dinamina-1 forma parte de la gran familia de proteínas denominadas proteínas similares a la dinamina. La dinamina-1 se expresa únicamente en cerebro, especialmente en las terminaciones nerviosas, ya que es en este lugar donde se produce la endocitosis de las vesículas sinápticas, proceso en el cual está muy implicada (Smillie y Cousin, 2005). En el estriado de ratas tratadas con morfina de forma crónica se ha detectado una disminución de la expresión de esta proteína (Bierczynska-Krzysik y col., 2006). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran niveles de expresión menores en los animales de los grupos que no extinguieron la conducta de búsqueda de la morfina con respecto a los animales que la extinguieron, aunque dicha diferencia sólo resulta significativa en la comparación NE MOR vs E MOR (figura 29, N-5904). Parece por tanto que la expresión de esta proteína estaría inversamente relacionada con la vulnerabilidad a los efectos adictivos de la morfina.

La enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se detectó en dos de los puntos analizados (figura 29, N-6210 y N- 7208), probablemente debido a las distintas modificaciones post-trasduccionales que sufre esta proteína; si bien el patrón de cambios fue similar en ambos puntos. Esta enzima está implicada en múltiples procesos biológicos; por ejemplo, participa en la glucólisis e interviene en la fosforilación endógena de la subunidad α del receptor del GABA_A, necesaria para mantener el buen funcionamiento del mismo (SidAhmed-Mezi y col., 2010). Además, el complejo formado por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la 3-fosfoglicerato quinasa se encarga de producir el ATP necesario para llevar a cabo la recaptación de glutamato en las vesículas sinápticas (Ikemoto y col., 2003). En la bibliografía se pueden encontrar descritas variaciones en la expresión cerebral de esta enzima tras la exposición a distintas drogas de abuso, entre las que se encuentra la morfina (Li y Wang, 2007). En nuestro ensayo la administración aguda de morfina al grupo de animales que extinguió la preferencia por el opiáceo produjo un aumento significativo de la expresión de esta proteína con respecto a su salino; este aumento no se produjo en los animales que no extinguieron la conducta de búsqueda de morfina (figura 29, N-6210). Este dato sugeriría que la capacidad de un individuo para aumentar la expresión de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa tras el consumo de morfina estaría inversamente relacionada con su vulnerabilidad a los efectos adictivos del opiáceo.

Por último, algunas proteínas sólo mostraron variaciones al comparar los grupos E MOR y NE MOR con su salino correspondiente. De entre ellas, se pudieron identificar la DRP-2, la subunidad α de la isocitrato deshidrogenasa [NAD], la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD⁺], la ATPasa de fusión de vesículas y la proteína de mielina básica S (figura 29; N-2613, N-3309, N-4210, N-5902, N-8007). Estas proteínas sólo servirían como marcadores de exposición aguda a morfina y no estarían directamente relacionadas con la vulnerabilidad diferencial. Sin embargo, conviene recordar que, como se ha descrito en apartados previos de esta memoria, la DRP-2 participa en el desarrollo de los axones, y que la exposición a diferentes sustancias adictivas, incluida la morfina, modifica su expresión (ver por ejemplo, Li y Wang, 2007); por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio confirmarían la implicación de esta proteína en los efectos de las drogas de abuso.

3.2.1.1. Análisis de la fosforilación de proteínas en el NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.

La morfina altera múltiples cascadas de transducción celular que afectan a la fosforilación de proteínas (Vanderschuren y col., 2001). Se ha descrito que dichas fosforilaciones son cruciales en los mecanismos de neuroadaptación implicados en la dependencia a esta droga (Kim y col., 2005). Por ello nos pareció interesante ampliar el estudio proteómico del NAcc con un análisis específico de la fosforilación de proteínas. Debido a la imposibilidad de realizar el ensayo con el NAcc de todos los grupos experimentales, se decidió llevarlo a cabo sólo con los grupos E SAL y NE SAL.

En este estudio se detectaron 9 puntos cuyo volumen varió significativamente al comparar los grupos E SAL y NE SAL. La tabla 26 muestra los valores de los volúmenes de estos puntos y el ratio NE SAL / E SAL.

Tabla 26: Puntos cuyo volumen varió significativamente en el estudio de fosforilación de proteínas realizado con el NAcc de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del volumen de cada proteína. E SAL: grupo Extingue + Salino; NE SAL: grupo No Extingue + Salino.

Ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina			
	E SAL (n=3)	NE SAL (n=3)	
Nº Punto	Volumen punto	Volumen punto	Ratio NE SAL/ E SAL
F-0026	571,60 \pm 65,86	239,20 \pm 14,25	0,42
F-0339	1084,00 \pm 543,70	2268,00 \pm 216,40	2,08
F-0414	1020,00 \pm 593,30	2080,00 \pm 215,00	2,04
F-0450	939,90 \pm 473,40	2124,00 \pm 91,35	2,27
F-0469	329,30 \pm 173,80	700,10 \pm 40,74	2,13
F-0482	670,10 \pm 351,30	1347,00 \pm 80,73	2,00
F-0790	991,30 \pm 148,10	2018,00 \pm 309,40	2,04
F-0924	390,00 \pm 203,20	1223,00 \pm 74,20	3,23
F-1289	318,40 \pm 169,80	710,40 \pm 104,50	2,22

La figura 31 muestra un gel representativo en el que se señalan los puntos que mostraron diferencias significativas en la comparación entre los grupos E SAL y NE SAL. Todos estos puntos se intentaron identificar por espectrometría de masas, aunque finalmente se consiguió identificar correctamente 7, los cuales quedan reflejados en la tabla 27. Como puede observarse, en la mayoría de los puntos seleccionados se identificó más de una proteína, por lo que dichas proteínas no se tendrán en cuenta en la discusión de los resultados. En la figura 32 se representa gráficamente la densidad óptica de los puntos en los que sólo se identificó una proteína. Dos de ellos correspondieron a la misma proteína (figura 32, F-339, F-0450), esto último puede obedecer a que dicha proteína presenta varias posiciones de fosforilación.

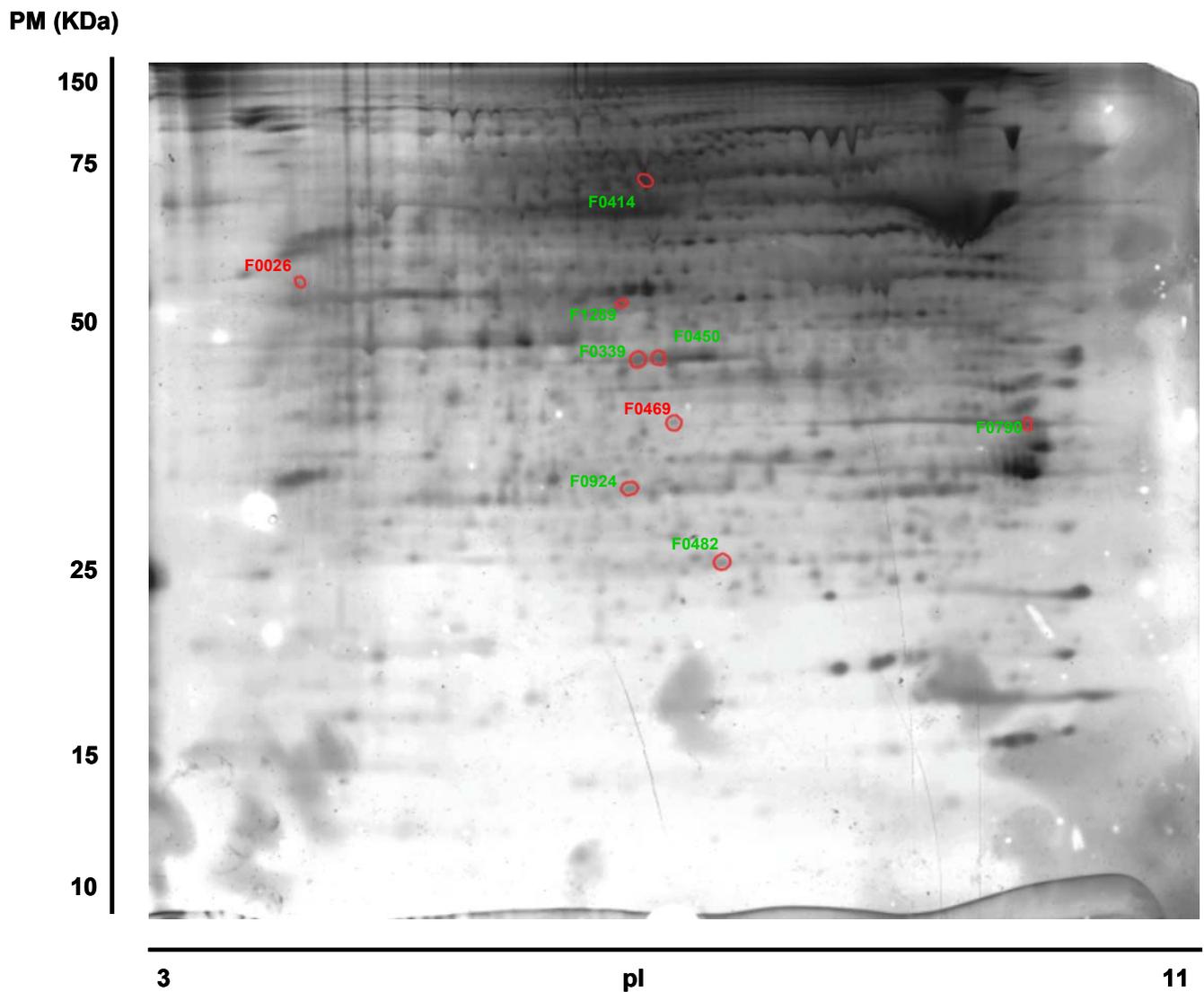


Figura 31: Gel bidimensional representativo de las proteínas fosforiladas del NAcc de los animales obtenidos en el ensayo de la extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. Las proteínas marcadas en color rojo mostraron diferencias en la expresión al comparar los grupos y las señaladas en color verde, además, se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 27: Proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina identificadas por espectrometría de masas. PM: Peso molecular; pl: Punto isoelectrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos NCBI.
*Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados
F-0339	Piridoxal (piridoxina, vitamina B6) quinasa	gi 13929082	62239	6,32	610	23	7
F-0414	Mezcla (Proteína 2 asociada a CAP-adenilato ciclasa / Proteína de unión a syntaxina 1)	gi 16758742/ gi 6981602	52879/ 67526	6,69/ 6,49	328/ 299	20/ 9	13/ 10
F-0450	Piridoxal (piridoxina, vitamina B6) quinasa	gi 13929082	62239	6,32	1150	44	29
F-0482	Mezcla (Rap 1A / Subunidad d de H-ATP sintasa mitocondrial)	gi 2116980/ gi 220904	10785/ 18770	5,37/ 5,78	108/ 61	5/ 14	5/ 3
F-0790	Mezcla (Tropomiosina 5 / Proteína de activación de Tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa)	gi 9653293/ gi 13928824	28930/ 29103	4,72/ 4,55	420/ 228	27/ 27	12/ 9
F-0924	Fosfoglicerato mutasa 1	P25113*	28814	6,67	490	36	16
F-1289	Mezcla (Similar a la proteína de unión 1 Pol(yrc) (α -CP1) (hnRNP-E1) / Fructosa bisfosfatasa aldolasa C)	gi 149036630/ gi 6978489	35490/ 39259	7,03/ 6,67	536/ 485	12/ 17	9/ 13

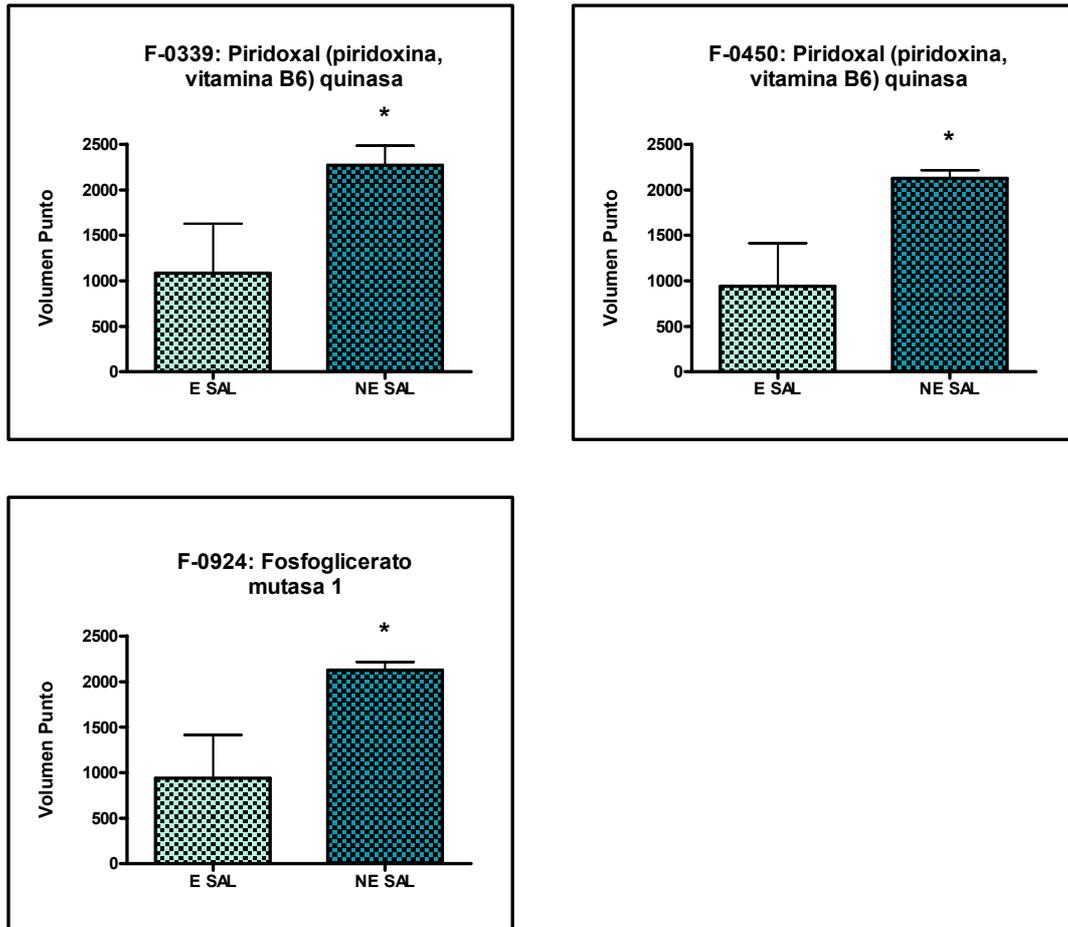


Figura 32: Expresión de las proteínas fosforiladas del NAcc de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por morfina identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D:O.) normalizada \pm E.S.M. E SAL: grupo Extingue + Salino; NE SAL: grupo No Extingue + Salino. * $p < 0,05$. (n=3)

Las proteínas fosforiladas que se consiguieron identificar mostraron una mayor expresión en el grupo NE SAL con respecto al E SAL y fueron la piroxidal quinasa y la fosfoglicerato mutasa 1.

La enzima piroxidal quinasa pertenece a la familia de las fosfotransferasas y es la encargada de activar el piridoxal (o vitamina B6), convirtiéndolo en piridoxal 5'-fosfato (McCromick y col., 1961). En su forma activa, el piridoxal actúa como cofactor de las enzimas encargadas de la síntesis de neurotransmisores, como la dopamina, la histamina, la serotonina o el glutamato (Combs, 2008). Entre dichas enzimas se encuentra la 4-aminobutirato aminotransferasa, encargada de la degradación del GABA y de la síntesis de glutamato y que, al igual que la piroxidal quinasa, mostró una mayor expresión en los animales NE SAL en el análisis de proteínas totales del NAcc, anteriormente descrito (ver figura 29, N-7511).

La fosfoglicerato mutasa 1 pertenece a la súperfamilia de las histidina fosfatasas que está formada por un gran número de proteínas de distintos grupos funcionales. Todas ellas poseen un núcleo de histidina que pasa a estar fosforilado al finalizar la reacción (Rigden, 2008). En estudios realizados sobre en cerebros de ratas sometidas al efecto de la metaanfetamina se ha visto una alteración de la expresión del gen que codifica para la fosfoglicerato mutasa B (Xie y col., 2002), lo cual podría tener cierta relación con nuestros resultados.

3.2.2. Análisis proteómico de la CPF de animales obtenidos en el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina.

Después de la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional y tras su tinción con nitrato de plata se obtuvieron geles en los que se pueden observar una serie de puntos que corresponden al mapa proteico de la CPF de los animales seleccionados (ver un ejemplo en la figura 33). Para la detección, emparejamiento y análisis de la densidad óptica de los puntos se utilizó el programa PD-Quest 8.0.1. La tabla 28 muestra para cada grupo experimental la media del número de puntos detectados.

Tabla 28: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles de la CPF de animales procedentes del ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. E SAL: Extingue + Salino; E MOR: Extingue + Morfina; NE SAL: No Extingue + Salino; NE MOR: No Extingue + Morfina. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M.

GRUPO	n	Puntos detectados
E SAL	6	1357 \pm 313,0
E MOR	5	1049 \pm 253,0
NE SAL	5	1323 \pm 403,3
NE MOR	6	949 \pm 194,6

En la tabla 29 se muestran todas las proteínas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 29: Proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de la densidad óptica (D.O.) normalizada de cada proteína. E SAL: grupo Extingue + Salino; E MOR: grupo Extingue + Morfina; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE MOR: grupo No Extingue + Morfina. * $p < 0,05$ vs E; # $p < 0,05$ vs SAL (E SAL y NE MOR, $n=6$; NE SAL y E MOR, $n=5$).

CPP MORFINA-CPF				
D.O. Normalizada				
Nº Punto	E SAL	E MOR	NE SAL	NE MOR
C-0114	22,68 \pm 8,55	15,06 \pm 8,89	36,14 \pm 10,37	13,42 \pm 2,69 [#]
C-2601	25,10 \pm 2,30	26,26 \pm 6,30	9,42 \pm 1,78*	18,28 \pm 3,75
C-2613	10,87 \pm 3,01	7,80 \pm 2,96	11,84 \pm 2,71	1,95 \pm 0,70 [#]
C-2903	1,93 \pm 0,50	1,98 \pm 0,92	2,44 \pm 0,24	1,22 \pm 0,43 [#]
C-4603	4,67 \pm 1,37	1,08 \pm 0,45 [#]	3,18 \pm 0,96	1,12 \pm 0,51
C-4805	1,92 \pm 0,19	0,94 \pm 0,38 [#]	2,240 \pm 0,67	2,03 \pm 0,65
C-5502	58,35 \pm 10,79	60,28 \pm 14,11	63,12 \pm 6,23	37,37 \pm 6,88 [#]
C-5603	4,45 \pm 1,44	1,76 \pm 0,13	6,40 \pm 3,03	2,87 \pm 0,35*
C-5705	1,45 \pm 0,317	1,34 \pm 0,10	2,32 \pm 0,278	1,95 \pm 0,18*
C-5811	1,68 \pm 0,34	0,80 \pm 0,33	2,78 \pm 0,56	2,23 \pm 0,46*
C-6008	14,27 \pm 3,61	11,32 \pm 2,04	29,16 \pm 6,65	12,07 \pm 1,44 [#]
C-6101	55,75 \pm 9,66	41,28 \pm 7,02	86,16 \pm 6,22*	50,40 \pm 4,71 [#]
C-6102	19,30 \pm 3,30	20,64 \pm 4,17	32,32 \pm 5,30	13,23 \pm 1,23 [#]
C-6103	18,68 \pm 2,51	12,94 \pm 1,11	24,88 \pm 1,82	14,75 \pm 2,01 [#]
C-6206	28,90 \pm 7,15	14,20 \pm 4,15	34,32 \pm 2,04	19,45 \pm 5,30 [#]
C-6603	4,05 \pm 3,48	0,62 \pm 0,62	2,14 \pm 0,33	0,60 \pm 0,38 [#]
C-7101	30,85 \pm 7,56	39,44 \pm 8,07	58,92 \pm 7,27*	13,18 \pm 4,50 ^{#*}
C-7801	8,42 \pm 1,29	6,56 \pm 2,39	2,68 \pm 1,68*	12,00 \pm 4,10
C-7804	44,65 \pm 4,28	25,82 \pm 8,68	23,30 \pm 5,74*	31,37 \pm 8,33
C-8503	14,13 \pm 3,40	6,94 \pm 1,63	14,46 \pm 4,40	4,52 \pm 1,28*
C-8602	9,35 \pm 2,03	5,82 \pm 1,18	8,62 \pm 1,67	3,27 \pm 0,85 [#]
C-9301	7,68 \pm 1,69	8,60 \pm 3,52	1,22 \pm 0,55*	6,50 \pm 3,40

En la figura 33 se muestra un gel representativo de las proteínas extraídas de la CPF. En dicho gel se han marcado las proteínas que mostraron diferencias significativas en las comparaciones anteriormente detalladas.

De entre todas las proteínas cuya densidad óptica varió significativamente, se seleccionaron aquellas en las que la variación de la densidad óptica fue al menos 1,5 veces superior al comparar un grupo con otro. En total se seleccionaron 17 proteínas. Finalmente se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 14 proteínas. Dichas proteínas se han señalado en color verde en el gel de la figura 33. Los datos de espectrometría de masas que sirvieron para la identificación de dichas proteínas se muestran en la tabla 30. En la figura 34 se representa gráficamente la densidad óptica de las proteínas identificadas.

A modo de resumen, en la tabla 31 se recogen las proteínas identificadas, indicando las comparaciones en las que mostraron diferencias significativas y, en esos casos, el ratio de variación.

En la figura 34 y en la tabla 31, no se incluyen los puntos que se detectaron como mezclas, ni tampoco el punto C-7101, que se identificó como la subunidad α -1/2 de la hemoglobina, ya que éste último se consideró una contaminación de la muestra.

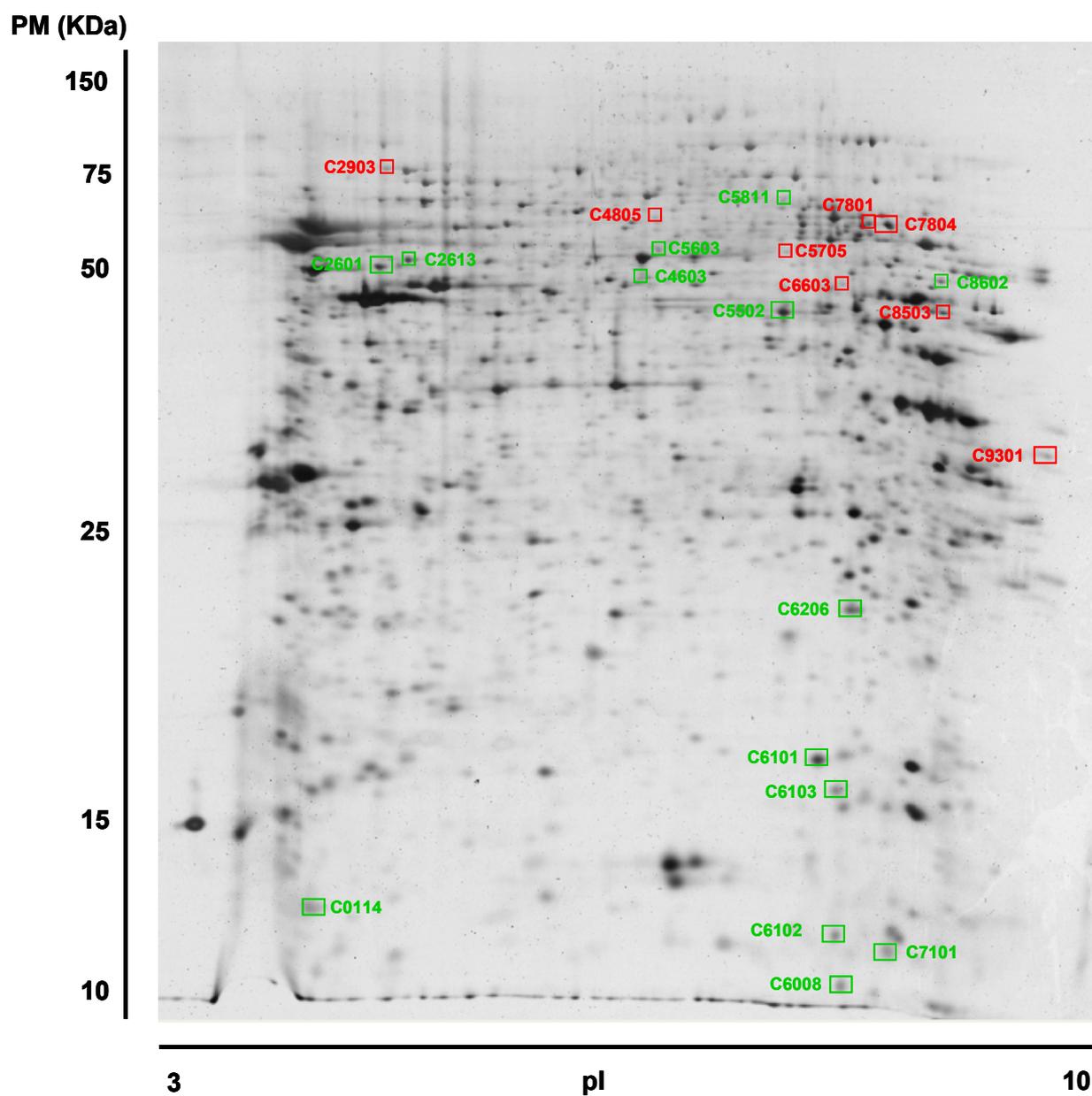


Figura 33: Gel bidimensional representativo de las proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de la extinción del condicionamiento preferencial al sitio inducido por morfina. Las proteínas marcadas mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos y las señaladas en color verde se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 30: Proteínas identificadas por espectrometría de masas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. PM: Peso molecular; pl: Punto isoeléctrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados	Secuencia MS/MS
C-0114	Subunidad 5A de la citocromo c oxidasa	P11240	16347	6,08	119	59	10(42)	
C-2601	Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1	Q68FY0	53500	5,57	252	51	28(65)	
C-2613	Proteína fibrilar ácida de la glia	P47819	49984	5,35	410	67	43(65)	
C-4603	Subunidad 11 del proteasoma 26S no-ATPasa	B5DEP6	48280	6,10	107	37	15(65)	
C-5502	Glutamina sintetasa	P09606	42982	6,64	281	57	29(65)	
C-5603	Septina-10	Q5PQK1	53860	6,56	32	1	2	HYELYS HYELYSR
C-5811	Proteína relacionada con la dihidropirimidinas-1	Q62950	62499	6,64	130	28	14(33)	
C-6008	Factor inhibitorio de migración de los macrófagos	P30904	12640	6,79	54	9	1	PMFIVNTNVPR
C-6101	Nucleósido difosfatasa quinasa B	P19804	17386	6,92	153	92	15(65)	
C-6102	Mezcla (Subunidad β -2 de la hemoglobina/ Subunidad β -1 de la hemoglobina)	P02091/ P11517	16086/ 16083	8,91/ 7,88	80/ 79	49/ 49	8(65)/ 8(65)	
C-6103	Peroxirredoxina-5	Q9R063	22507	8,94	111	43	13(65)	
C-6206	Mezcla (Isoenzima adenilato quinasa/ Proteína 3 similar al factor de ribosilación del ADP)	P39069/ P37996	21684/ 20615	7,66/ 6,74	156/ 116	65/ 63	15(65)/ 11(65)	
C-7101	Subunidad α -1/2 de la hemoglobina	P01946	15490	7,82	100	69	10(65)	
C-8602	Fumarato hidratasa mitocondrial	P14408	54714	9,06	54	17	6(20)	

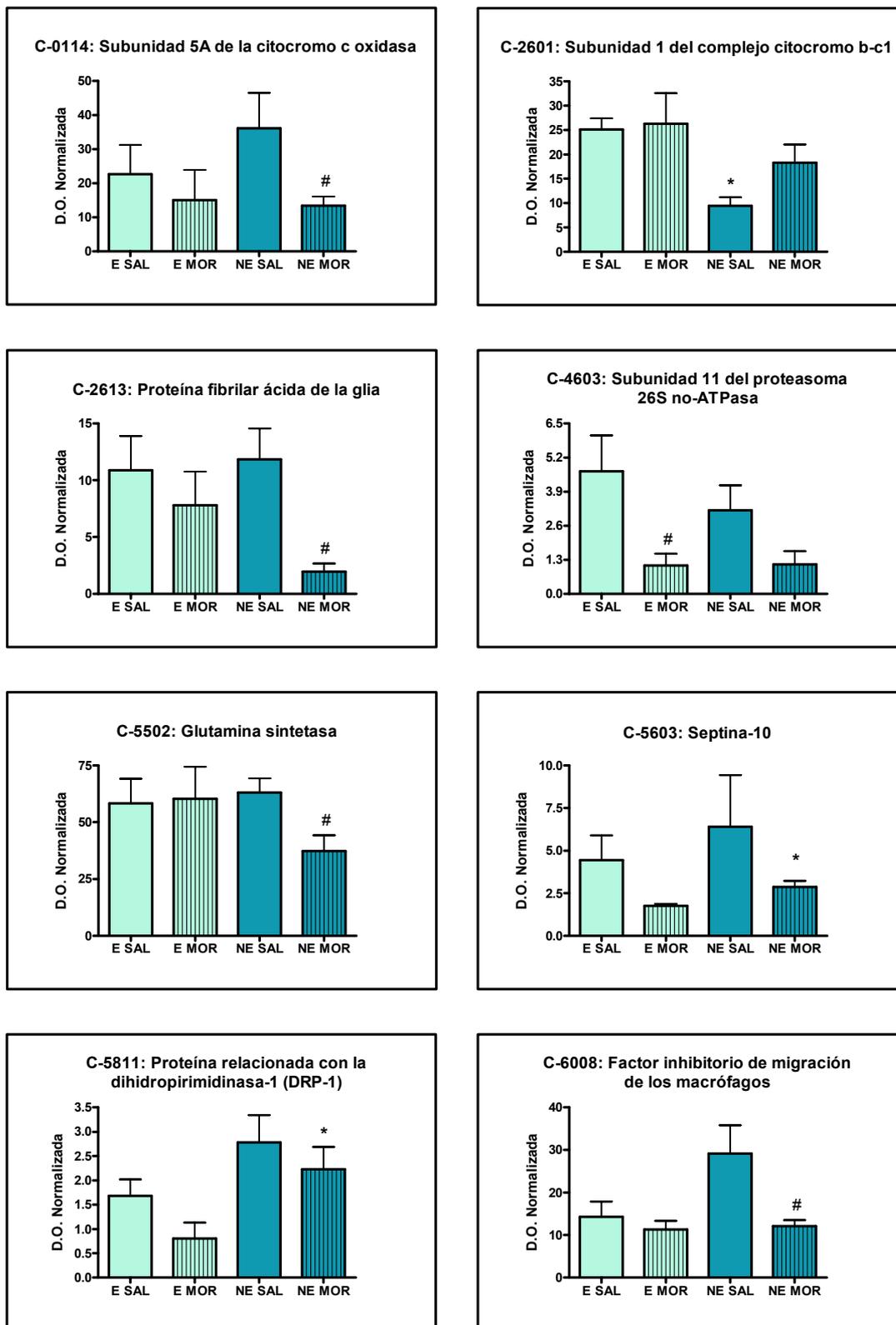


Figura 34: Expresión de las proteínas de la CPF de animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducido por morfina identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D:O.) normalizada \pm E.S.M. E SAL: grupo Extingue + Salino; E MOR: grupo Extingue + Morfina; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE MOR: grupo No Extingue + Morfina. * $p < 0,05$ vs E; [#] $p < 0,05$ vs SAL (E SAL y NE MOR, $n=6$; NE SAL y E MOR, $n=5$).

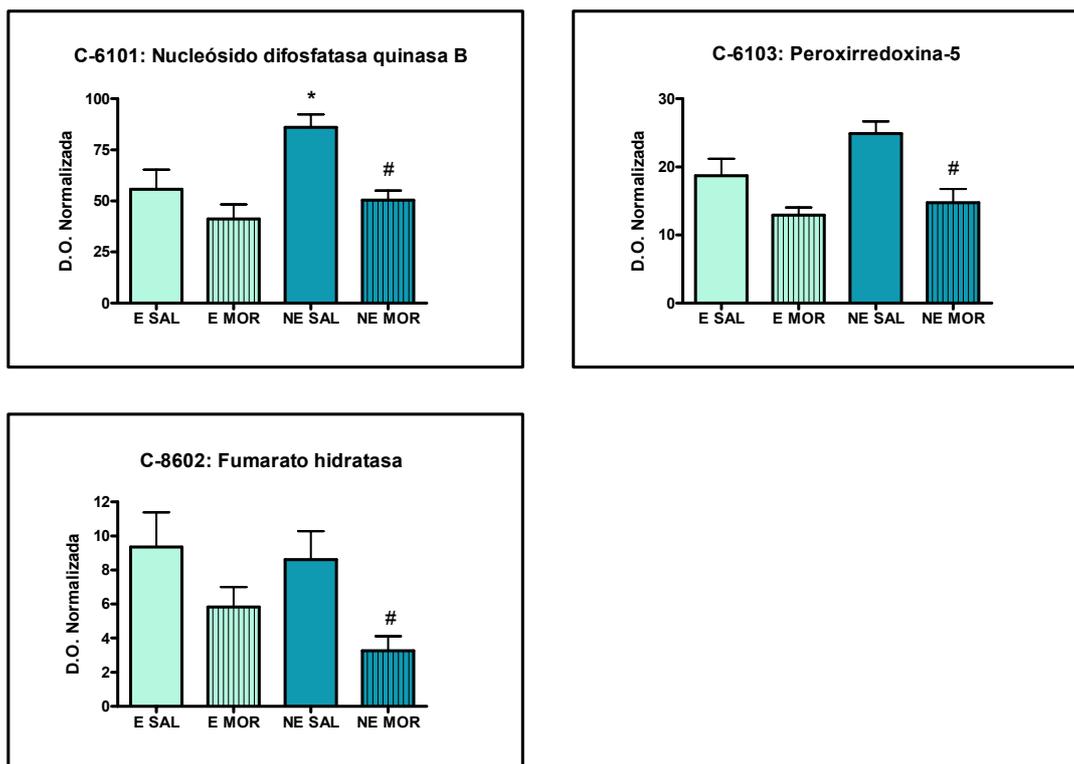


Figura 34: Continuación

Tabla 31: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas de la CPF de los animales obtenidos tras el ensayo de extinción de la preferencia al sitio inducida por morfina. E SAL: grupo Extingue + Salino; E MOR: grupo Extingue + Morfina; NE SAL: grupo No Extingue + Salino; NE MOR: grupo No Extingue + Morfina. n.s. diferencia no significativa en la comparación de estos grupos.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Ratio densidades ópticas normalizadas			
		NE SAL/ E SAL	NE MOR/ E MOR	E MOR/ E SAL	NE MOR/ NE SAL
C-0114	Subunidad 5A de la citocromo c oxidasa	n.s.	n.s.	n.s.	0,37
C-2601	Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1	0,37	n.s.	n.s.	n.s.
C-2613	Proteína fibrilar ácida de la glia	n.s.	n.s.	n.s.	0,16
C-4603	Subunidad 11 del proteasoma 26S no-ATPasa	n.s.	n.s.	0,23	n.s.
C-5502	Glutamina sintetasa	n.s.	n.s.	n.s.	0,59
C-5603	Septina-10	n.s.	1,63	n.s.	n.s.
C-5811	Proteína relacionada con la dihidropirimidinas-1	n.s.	2,79	n.s.	n.s.
C-6008	Factor inhibitorio de migración de los macrófagos	n.s.	n.s.	n.s.	0,41
C-6101	Nucleósido difosfatasa quinasa B	1,54	n.s.	n.s.	0,58
C-6103	Peroxirredoxina-5	n.s.	n.s.	n.s.	0,59
C-8602	Fumarato hidratasa mitochondrial	n.s.	n.s.	n.s.	0,38

De la misma manera que se hizo con el NAcc, se comparó la expresión proteica de la CPF de los animales de los grupos **E SAL y NE SAL**, con el fin de identificar las proteínas responsables de la vulnerabilidad a la adicción a morfina. En esta comparación sólo se consiguieron identificar 2 de las proteínas que mostraron diferencias significativas: la subunidad 1 del complejo citocromo b-c1, cuya expresión disminuyó en el grupo NE SAL, y la nucleósido difosfatasa quinasa B, cuya expresión se vio aumentada en el grupo NE SAL (figura 34; C-2601, C-6101). Ambas proteínas están principalmente implicadas en procesos de producción de energía.

El complejo b-c1 (también denominado ubiquinol-citocromo c reductasa, o complejo III), forma parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y participa en la fosforilación oxidativa. Este complejo está formado por 11 subunidades; la subunidad 1, detectada en este estudio, forma parte del núcleo principal de dicho complejo (Iwata y col., 1998). En ratas dependientes de morfina se ha detectado una disminución en la expresión de esta misma proteína (Bierczynska-Krzysik y col., 2006), por lo que se podría equiparar con nuestros resultados ya que el grupo de animales NE SAL aumentó significativamente la expresión cuando se comparó con E SAL (figura 34, C-2601).

Como se ha comentado anteriormente en esta memoria (ver “Resultados y Discusión” del NAcc de animales obtenidos en el ensayo de CPP inducido por cocaína), la proteína nucleósido difosfatasa quinasa B participa en la síntesis de nucleósidos trifosfato como el ATP (Ishikawa y col., 1992) y su expresión se modifica en animales que difieren en la velocidad de extinción de la conducta de búsqueda de cocaína. En el presente estudio el grupo NE SAL muestra un aumento en la expresión de esta proteína frente al grupo de animales que extinguió la conducta (E SAL) (figura 34, C-6101); sin embargo, la administración de una nueva dosis de morfina revierte este aumento. Este patrón de cambios podría ser compatible con la implicación de la nucleósido difosfatasa quinasa B en el síndrome de abstinencia a morfina.

Para observar las diferencias en la expresión de proteínas debidas a una nueva administración de morfina, en animales con distinta vulnerabilidad a dicha droga, se realizó la comparación entre los grupos **E MOR y NE MOR**. Por espectrometría de masas se consiguió identificar 2 proteínas, cuya expresión fue mayor en el grupo NE MOR (figura 34; C-5603, C-5811). Estas proteínas fueron la septina-10 y la proteína relacionada con la dihidropirimidasa-1 (DRP-1).

La septinas pertenecen a la familia de proteínas de unión a GTP, las cuales son esenciales para la citogénesis, el tráfico vesicular, la reorganización del citoesqueleto y la dinámica de la membrana celular. Se expresan abundantemente en células mitóticas aunque también en células no divisibles, como las neuronas. Este tipo de proteínas están relacionadas con un amplio abanico de procesos patológicos como infecciones, neoplasias, o enfermedades neurodegenerativas (Roeseler y col., 2009). En concreto se han detectado cambios en la expresión de esta familia de proteínas en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (Peterson y Petty, 2010). Además, el consumo de nicotina y morfina se ha relacionado con cambios en la expresión de la septina-5 (Li y Wang, 2007). En nuestros resultados se puede observar como los niveles de la septina-10 son significativamente mayores en el grupo NE MOR cuando se comparó con E MOR (figura 34, C-5603). Además, los valores de la expresión de esta proteína, aunque no son significativos, son menores en los grupos de animales que reciben una nueva administración de morfina (E MOR y NE MOR) con respecto a sus salinos. Por ello podríamos concluir, que los niveles de expresión de la septina-10 se ven influenciados tanto por la diferencia en la vulnerabilidad a los efectos de la morfina como por la nueva administración de dicha droga.

La DRP-1, al igual que la DRP-2, interviene en el crecimiento del axón actuando como mediadora de la respuesta intracelular a la semaforina 3 (Ujike y col., 2006). En el NAcc de estos animales y de los procedentes de los otros estudios realizados en esta Tesis, también se detectaron alteraciones en la expresión de la DRP-2. Además, en la literatura se pueden encontrar estudios en los que se observan alteraciones en la expresión de las proteínas relacionadas con la dihidropirimidasa tras la exposición a sustancias adictivas (Li y Wang, 2007; Bozdon-Kulakowska y col., 2010). En este ensayo de nuevo encontramos modificada la expresión de una de ellas, DRP-1. Los niveles de expresión de esta proteína están aumentados en los grupos de animales que no extinguen la conducta de búsqueda de la morfina, siendo sólo significativo este aumento en los animales que recibieron una nueva dosis de la droga (figura 34, C-5811). Teniendo en cuenta todo lo anterior, la DRP-1 podría ser considerada como un buen marcador en la vulnerabilidad diferencial a adicción a la morfina.

Por último, algunas proteínas sólo mostraron variaciones al comparar los grupos E MOR y NE MOR con su salino correspondiente, por lo que dichas proteínas estarían principalmente relacionadas con los efectos agudos de la droga y su implicación en la vulnerabilidad no sería tan directa. Entre ellas pudimos identificar las siguientes: subunidad 5A de la citocromo c oxidasa, proteína fibrilar ácida de la glia (PFAG),

subunidad 11 del proteasoma 26S, glutamina sintetasa, factor inhibitorio de migración de los macrófagos, peroxirredoxina-5, y fumarato hidratasa (figura 34; C-0114, C-2613, C-4603, C-5502, C-6008, C-6103, C-8602).

La peroxirredoxina-5 y la fumarato hidratasa ya se perfilaron como posibles marcadores de vulnerabilidad diferencial a los efectos de las drogas en los ensayos en los animales procedentes del CPP de cocaína. Respecto a la PFAG y la glutamina sintetasa, sus funciones biológicas así como su implicación en procesos relacionados con las drogas de abuso, se comentarán en apartados posteriores ya que su expresión varió en comparaciones con mayor relevancia en lo que a susceptibilidad a los efectos de las drogas se refiere.

La subunidad 5A de la citocromo c oxidasa, y la subunidad 11 del proteasoma 26S están relacionadas con el citocromo b-c1 y con la UCHL1, respectivamente. Estas últimas proteínas se han identificado en el presente estudio como posibles marcadores de vulnerabilidad diferencial a morfina.

El factor inhibitorio de migración de los macrófagos es una citoquina proinflamatoria que se encuentra altamente expresada en múltiples tejidos (Metz y Bucala, 1997). La expresión de esta proteína en neuronas es bastante elevada en condiciones basales y los estímulos proinflamatorios producen una marcada regulación al alza (Bacher y col., 1998). En líquido cefaloraquídeo de enfermos de Alzheimer se ha observado un aumento de la expresión de esta proteína, por lo que se ha hipotetizado que podría tener un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad (Bacher y col., 2010). Actualmente no existen referencias bibliográficas que relacionen esta proteína con el consumo de drogas. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio muestran un aumento en su expresión en el grupo NE SAL respecto a los demás grupo experimentales, aunque este aumento sólo se hace significativo en la comparación NE SAL vs NE MOR (figura 34, C-6008). Este patrón de expresión podría sugerir que el factor inhibitorio de migración de los macrófagos podría estar implicado en el síndrome de abstinencia de morfina.

3.2.3. Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas detectadas en el NAcc y la CPF de los animales procedentes del CPP de morfina.

De nuevo, y como ya se realizó con los resultados obtenidos en los dos núcleos cerebrales estudiados del CPP de cocaína, se utilizó el programa “Ingenuity Pathways Análisis”, con el objetivo de agrupar las proteínas obtenidas en función de los procesos biológicos en los que participan y que por lo tanto, puedan estar influyendo en la susceptibilidad a los efectos de la morfina. Para este análisis se emplearon sólo las proteínas cuya expresión varió significativamente en las comparaciones NE SAL vs E SAL y NE MOR vs EMOR.

La mayoría de las proteínas detectadas en ambas comparaciones se agruparon significativamente en los procesos de “**organización y ensamblaje celular**” y de “**comunicación y señalización celular**”. Además, en la comparación NE SAL vs E SAL se incluyen los procesos “**degradación de radicales libres**” y “**fosforilación oxidativa**”, mientras que en la comparación NE MOR vs E MOR se incluyó el “**metabolismo de ácidos nucleicos**” (tabla 32, figura 35).

El programa “Ingenuity Pathways Analysis” también se utilizó para generar redes de conexiones entre las proteínas identificadas en este estudio. En la comparación NE MOR vs EMOR el número de proteínas detectadas fue insuficiente para generar este tipo de redes, por lo que sólo se muestran las conexiones de las proteínas detectadas en la comparación NE SAL vs E SAL (figura 36).

Tabla 32: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de morfina. Las proteínas marcadas en verde presentaron mayor expresión en los animales NE, las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en los animales E. (n.s., proceso no significativo).

PROCESO BIOLÓGICO	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN EL CPP DE MORFINA	
	NE SAL vs E SAL	NE MOR VS E MOR
Comunicación y señalización celular	-Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa, isoforma 1 (UCHL1) -Proteína de unión a syntaxina-1 -Cofilina-1 -Nucleósido difosfatasa quinasa B -Peroxiredoxina-2	-Dinamina-1
Organización y ensamblaje celular	-Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa, isoforma 1 (UCHL1) -Proteína de unión a syntaxina-1 -Cofilina-1 -Inhibidor 1 de disociación Rho GDP -α-internexina	-Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa -Dinamina-1 -Proteína relacionada con la dihidropirimidinas-1 (DRP-1)
Degradación de radicales libres	-NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 1 -Peroxirredoxina-2 -Peroxirredoxina-1	n.s.
Fosforilación oxidativa	-ATP sintasa , subunidad γ -NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 1 -Citocromo b-c1, subunidad 1	n.s.
Metabolismo de ácidos nucleicos	n.s.	-Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa -Adenosilhomocisteínasa -Proteína relacionada con la dihidropirimidinas-1 (DRP-1)

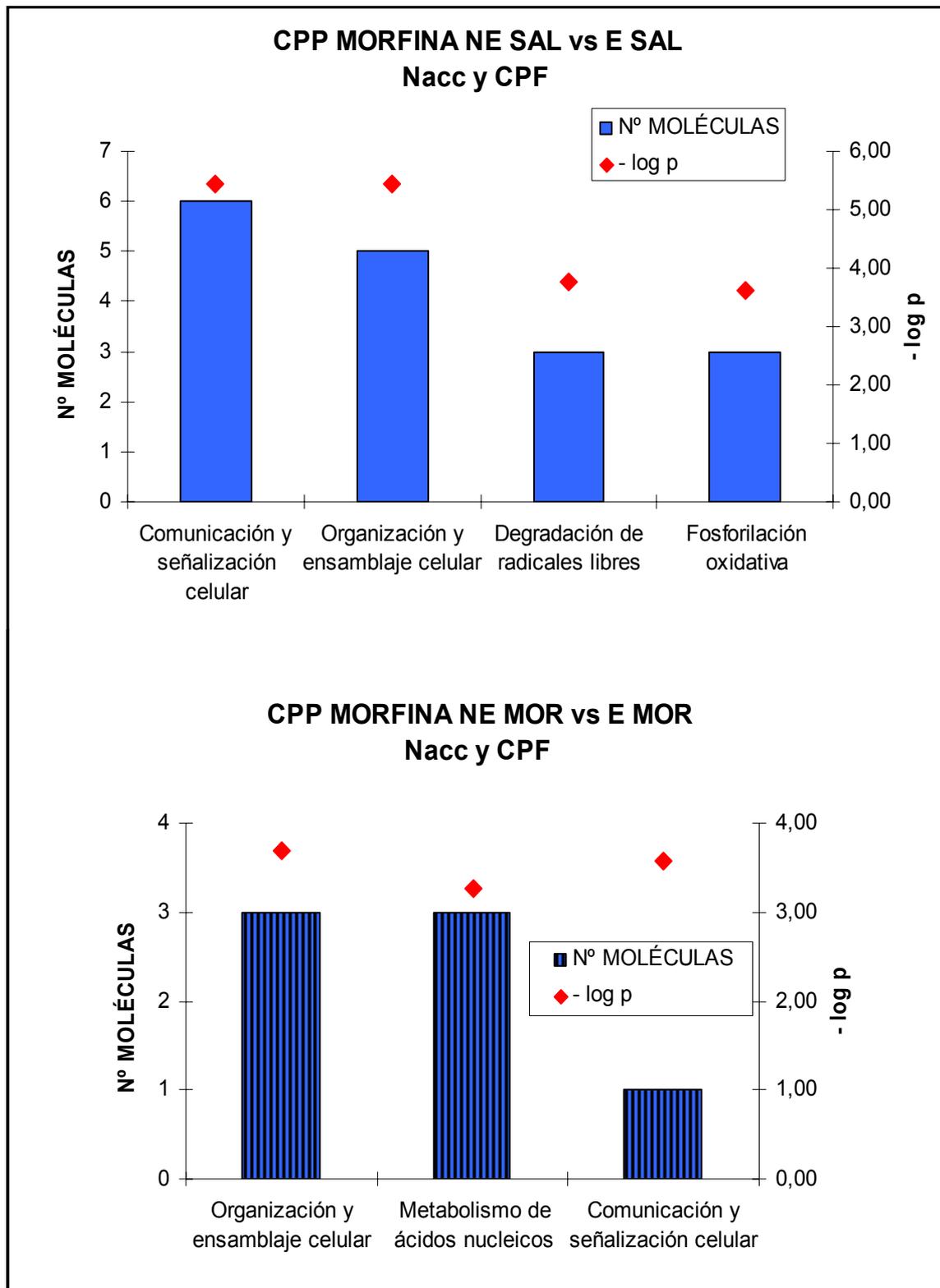


Figura 35: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en el CPP de morfina.

**Abreviaturas de las proteínas incluidas en la figura 36
(Conexiones NE SAL vs E SAL)**

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
ABBAT	4 aminobutirato amino transferasa
APP	amyloid beta (A4) precursor protein
ARHGDI1	inhibidor 1 de disociación Rho GDP
ARRB1	arrestin, beta 1
ATP5C1	ATP sintasa , subunidad γ
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
CFL1	cofilina-1
DLG4	discs, large homolog 4 (Drosophila)
DOC2B	double C2-like domains, beta
HNRNPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
IL4	interleukin 4
INA	α -internexina
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NDUFS1	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 1
NME2	nucleósido difosfatasa quinasa B
PRDX1	peroxirredoxina-1
PRDX2	peroxirredoxina-2
PRDX4	peroxiredoxin 4
PDXK	Piridoxal quinasa
PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1
RHOH	ras homolog gene family, member H
RPS27A	ribosomal protein S27a
STXBP1	proteína de unión a syntaxina-1
STXBP5	syntaxin binding protein 5 (tomosyn)
SYNGAP1	synaptic Ras GTPase activating protein 1
SYTL3	synaptotagmin-like 3
TGFB1:	Tumoral growth factor 1
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
UCHL1	ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa, isoforma 1
UQCRC1	citocromo b-c1, subunidad 1
USP21	amyloid beta (A4) precursor protein

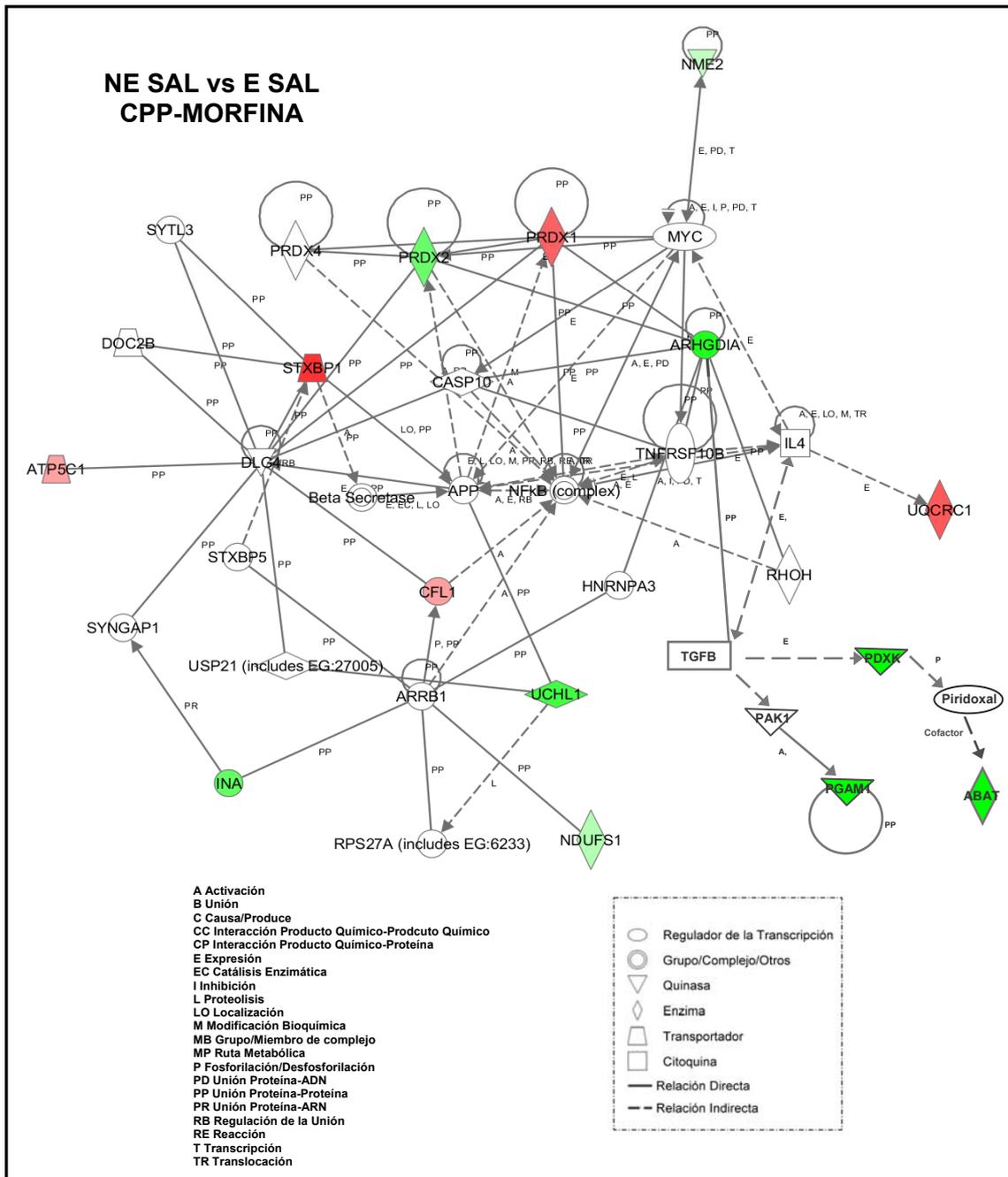


Figura 36: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación NE SAL vs E SAL del CPP de morfina. Las moléculas marcadas en verde presentaron mayor expresión en el grupo NE SAL y las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en el grupo E SAL. La intensidad del color de las proteínas indica en grado de regulación. Las proteínas en blanco no se detectaron en nuestro estudio. Las abreviaturas de los nombres de las proteínas de la figura se detallan en la página anterior.

3.3. Análisis proteómico de núcleos cerebrales de ratas F344 y Lewis.

Existen múltiples referencias en la bibliografía que demuestran la diferente respuesta a los efectos de las drogas de abuso entre las ratas F344 y Lewis, lo que avala la utilización de estas razas para el estudio de la vulnerabilidad a los efectos de dichas sustancias.

Tras la extracción de los núcleos cerebrales de interés (NAcc y CPF) de los animales F344 y Lewis que habían sido tratados previamente con suero, morfina (10 mg/kg) o cocaína (15 mg/kg), se procedió al análisis proteómico de dichos núcleos mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas.

Como se ha comentado en el capítulo de Material y Métodos, los grupos experimentales y las comparaciones establecidas fueron las siguientes:

a) F SAL vs L SAL: En esta comparación se estudian las diferencias en la expresión proteica a nivel basal en animales que muestran distinta vulnerabilidad a los efectos adictivos de cocaína o morfina.

b) F COC vs L COC; F MOR vs L MOR: Estas comparaciones permiten el estudio de las diferencias en la expresión proteica derivadas de la administración aguda de cocaína o morfina en animales con distinta vulnerabilidad a los efectos de dichas drogas.

c) F SAL vs F COC; L SAL vs L COC; F SAL vs F MOR; L SAL vs L MOR: Estas comparaciones se establecieron con el fin de observar los cambios en la expresión proteica inducidos por la administración aguda de cocaína o morfina.

Las comparaciones de los apartados a) y b) permiten caracterizar perfiles de expresión proteica que podrían funcionar como marcadores directos de vulnerabilidad, bien previos al consumo de la droga o bien posteriores al mismo. Por ello, los resultados obtenidos de dichas comparaciones se discutirán con más detalle.

Además, estos experimentos se diseñaron con la idea de poder encontrar correlaciones con los resultados obtenidos en los ensayos de condicionamiento preferencial al sitio inducido por cocaína o morfina, ya que dichas correlaciones nos ayudarían a encontrar las proteínas más implicadas en los procesos de vulnerabilidad.

Por tanto, en la discusión de los resultados detallaremos las similitudes encontradas con los resultados obtenidos en los ensayos de CPP.

3.3.1. Análisis proteómico del NAcc de ratas F344 y Lewis.

Después de la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional, y tras su tinción con nitrato de plata, se obtuvieron geles en los que se pueden observar una serie de puntos que corresponden al mapa proteico del NAcc de las ratas F344 y Lewis (ver un ejemplo en la figura 37). Para la detección, emparejamiento y análisis de la densidad óptica de los puntos se utilizó el programa PD-Quest 8.0.1. La tabla 33 muestra para cada grupo experimental, la media del número de puntos detectados.

Tabla 33: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles del NAcc de animales F344 y Lewis. F SAL: F344 + Salino; F MOR: F344 + Morfina; F COC: F344 + Cocaína; L SAL: Lewis + Salino; L MOR: Lewis + Morfina; L COC: Lewis + Cocaína. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M.

GRUPO	n	Puntos detectados
F SAL	6	781,3 \pm 72,51
F MOR	6	498,2 \pm 41,83
F COC	6	727,0 \pm 121,10
L SAL	6	895,2 \pm 182,00
L MOR	5	964,0 \pm 299,10
L COC	6	784,8 \pm 129,90

En la tabla 34 se muestran todas las proteínas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 34: Proteínas del NAcc de animales F344 y Lewis cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de la densidad óptica (D.O.) normalizada de cada proteína. F SAL: F344 + Salino; L SAL: Lewis + Salino; F COC: F344 + Cocaína; L COC: Lewis + Cocaína; F MOR: F344 + Morfina; L MOR: Lewis + Morfina. * $p < 0,05$ vs F344; # $p < 0,05$ vs SAL; n.d.: proteína no detectada. (n=6 para todos los grupos excepto L MOR: n=5)

F344 y Lewis NAcc						
D.O. normalizada						
Nº Punto	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
N-0001	n.d.	457,9 \pm 90,87	340,40 \pm 25,00	488,70 \pm 52,16*	443,1 \pm 43,00	424,2 \pm 76,52
N-0002	49,00 \pm 11,89	57,67 \pm 11,43	26,90 \pm 3,51	45,12 \pm 4,75*	30,45 \pm 14,15	82,88 \pm 33,73
N-0003	237,50 \pm 41,54	161,05 \pm 32,75	110,00 \pm 8,82 [#]	178,25 \pm 39,55	178,35 \pm 30,09	212,18 \pm 82,29
N-0016	30,72 \pm 10,33	22,30 \pm 4,19	26,35 \pm 10,87	68,67 \pm 14,39 [#]	32,83 \pm 12,31	63,66 \pm 24,41
N-0102	491,02 \pm 54,10	569,88 \pm 49,32	422,03 \pm 58,48	607,52 \pm 97,280	422,90 \pm 42,39	634,92 \pm 73,66*
N-0117	1037,00 \pm 153,30	1029,72 \pm 292,86	1374,85 \pm 120,31	1706,40 \pm 443,17	1807,00 \pm 103,70 [#]	1673,04 \pm 259,85
N-1010	52,23 \pm 8,67	31,08 \pm 13,98	26,47 \pm 8,48	59,44 \pm 11,81	14,62 \pm 8,03 [#]	26,82 \pm 26,82
N-1106	72,47 \pm 7,67	45,20 \pm 15,19	27,30 \pm 5,48 [#]	48,78 \pm 13,32	48,23 \pm 16,59	76,56 \pm 34,22
N-1201	30,40 \pm 6,00	11,35 \pm 6,49	13,50 \pm 4,34 [#]	17,60 \pm 8,09	23,53 \pm 8,04	15,06 \pm 7,85
N-1204	55,50 \pm 5,42	33,13 \pm 14,00	25,40 \pm 7,72 [#]	40,83 \pm 12,80	36,62 \pm 7,84	25,16 \pm 10,30
N-1505	31,38 \pm 5,38	22,62 \pm 10,44	13,88 \pm 6,44	25,35 \pm 9,22	15,12 \pm 3,71 [#]	27,68 \pm 15,49
N-2202	35,68 \pm 3,10	20,67 \pm 4,71*	30,63 \pm 7,60	18,08 \pm 6,30	22,73 \pm 4,84	26,52 \pm 8,78
N-2304	16,87 \pm 1,74	10,15 \pm 4,76	12,67 \pm 3,71	11,27 \pm 4,59	8,68 \pm 3,23 [#]	13,96 \pm 5,87
N-2902	168,20 \pm 41,82	129,90 \pm 40,05	198,00 \pm 22,91	114,40 \pm 15,77*	198,80 \pm 33,97	104,00 \pm 40,59
N-3001	133,30 \pm 19,77	97,87 \pm 25,83	89,62 \pm 20,66	82,80 \pm 19,83	60,72 \pm 19,96 [#]	98,92 \pm 39,57

Tabla 34: Continuación

	F344 y Lewis NAcc (Continuación)					
	D. O. Normalizada					
Nº Punto	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
N-3001	133,30 ± 19,77	97,87 ± 25,83	89,62 ± 20,66	82,80 ± 19,83	60,72 ± 19,96 [#]	98,92 ± 39,57
N-3004	118,90 ± 14,08	90,88 ± 16,45	90,82 ± 12,77	55,08 ± 15,58	70,93 ± 11,71 [#]	82,70 ± 24,63
N-3005	49,98 ± 5,84	26,40 ± 10,21	27,47 ± 9,26	16,20 ± 7,68	17,77 ± 8,77 [#]	35,72 ± 8,80
N-3102	37,08 ± 4,88	15,13 ± 6,78*	17,80 ± 6,19 [#]	13,30 ± 6,23	12,08 ± 5,25 [#]	13,20 ± 8,07
N-3104	1,35 ± 1,35	7,67 ± 2,88	0,88 ± 0,66	6,37 ± 2,16*	0,22 ± 0,06	10,24 ± 5,32
N-3201	25,28 ± 3,38	12,98 ± 5,90	15,30 ± 4,55	22,53 ± 5,76	12,35 ± 4,18 [#]	24,68 ± 5,94
N-3203	16,85 ± 2,22	8,38 ± 4,97	9,60 ± 1,65	13,86 ± 4,23	8,67 ± 2,46 [#]	8,17 ± 3,69
N-3208	10,70 ± 1,38	6,72 ± 3,12	6,00 ± 2,11	3,80 ± 1,78	3,25 ± 1,58 [#]	3,24 ± 2,08
N-3501	14,53 ± 2,96	6,22 ± 3,27	9,42 ± 4,02	10,78 ± 5,33	4,17 ± 2,10 [#]	12,18 ± 5,28
N-3601	36,78 ± 12,33	5,75 ± 2,62*	20,83 ± 4,27	11,75 ± 2,98	7,58 ± 2,87 [#]	4,40 ± 2,22
N-3602	14,12 ± 1,81	6,33 ± 2,92*	13,15 ± 4,87	12,53 ± 7,20	8,40 ± 4,25	35,92 ± 26,40
N-3603	97,07 ± 25,50*	35,18 ± 8,23	58,02 ± 11,77	180,70 ± 127,70	45,00 ± 14,88	33,40 ± 11,23
N-3609	33,65 ± 7,56	22,47 ± 5,89	38,08 ± 5,94	27,83 ± 5,58	45,22 ± 7,74	15,38 ± 9,31*
N-3704	69,83 ± 8,05	40,75 ± 8,21*	61,80 ± 11,51	44,42 ± 11,37	44,20 ± 10,64	43,06 ± 8,41
N-3714	8,57 ± 2,19	9,38 ± 4,20	7,20 ± 2,77	5,20 ± 2,33	2,75 ± 1,34 [#]	4,60 ± 2,02
N-3716	8,35 ± 0,86	5,72 ± 2,56	6,55 ± 3,07	4,20 ± 2,01	2,35 ± 1,13 [#]	5,16 ± 2,15
N-3904	6,65 ± 0,68	n.d.	3,28 ± 1,21 [#]	n.d.	2,20 ± 0,82	0,30 ± 0,30

Tabla 34: Continuación

	F344 y Lewis NAcc (Continuación)					
	D. O. Normalizada					
Nº Punto	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
N-4001	121,40 ± 8,07	91,08 ± 8,06*	90,15 ± 6,94 [#]	60,63 ± 14,26	89,12 ± 8,37 [#]	63,80 ± 20,06
N-4002	11,28 ± 2,59	18,78 ± 5,51	7,25 ± 1,82	5,63 ± 1,95	3,12 ± 1,98 [#]	4,26 ± 2,804
N-4103	18,83 ± 3,18	23,22 ± 2,48	16,00 ± 3,26	12,17 ± 3,46 [#]	11,58 ± 5,98	16,56 ± 4,26
N-4402	39,57 ± 4,57	28,70 ± 5,90	25,88 ± 5,56	19,62 ± 8,98	21,07 ± 2,71 [#]	21,18 ± 6,90
N-4605	53,88 ± 5,25	38,72 ± 3,28*	41,77 ± 14,32	27,17 ± 9,45	27,68 ± 7,50 [#]	32,00 ± 11,92
N-4703	13,08 ± 2,99	8,68 ± 1,91	14,75 ± 1,85	8,88 ± 1,67*	10,77 ± 3,57	23,34 ± 8,60
N-4711	4,57 ± 1,48	3,92 ± 1,36	6,80 ± 3,24	1,53 ± 0,69	0,90 ± 0,59	4,38 ± 1,52*
N-5002	23,42 ± 4,58	32,00 ± 5,54	9,87 ± 3,41 [#]	23,67 ± 6,73	10,60 ± 6,70	17,08 ± 5,06
N-5102	34,50 ± 2,28	32,00 ± 5,54	25,08 ± 3,37 [#]	23,67 ± 6,73	10,60 ± 6,70	17,08 ± 5,06
N-5103	04,23 ± 0,82	6,90 ± 0,54*	4,45 ± 0,52	3,18 ± 1,43	2,33 ± 1,48	3,22 ± 2,08
N-5104	24,47 ± 2,16	32,73 ± 5,63	13,27 ± 2,62 [#]	22,28 ± 6,53	16,85 ± 5,48	23,06 ± 2,46
N-5406	17,25 ± 2,71	28,32 ± 3,93*	10,55 ± 3,77	26,28 ± 6,90	15,05 ± 3,64	26,38 ± 2,70*
N-5506	10,15 ± 5,54	26,80 ± 7,56	3,48 ± 3,48	7,97 ± 2,72	9,40 ± 5,15	34,40 ± 8,15*
N-5612	0,77 ± 0,77	1,47 ± 0,94	1,00 ± 0,45	3,30 ± 0,48*	2,22 ± 0,60	5,66 ± 1,26*
N-5802	4,58 ± 1,67	10,77 ± 4,53	7,47 ± 3,56	3,00 ± 1,17	3,53 ± 1,67	9,26 ± 1,74*
N-5908	53,22 ± 7,10	49,87 ± 6,37	71,12 ± 8,47	45,37 ± 4,64*	68,52 ± 21,21	55,96 ± 15,23
N-6101	357,50 ± 25,48	349,20 ± 26,25	282,80 ± 10,85 [#]	347,90 ± 20,54*	335,00 ± 24,71	328,40 ± 27,18

Tabla 34: Continuación

F344 y Lewis NAcc (Continuación)						
D. O. Normalizada						
Nº Punto	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
N-6203	49,03 ± 4,95	48,20 ± 8,03	50,28 ± 6,96	35,30 ± 12,76	61,73 ± 10,92	27,0 ± 8,78*
N-6205	2,63 ± 2,63	3,47 ± 2,70	11,00 ± 5,35	12,15 ± 2,45 [#]	8,42 ± 5,47	5,82 ± 3,58
N-6401	115,90 ± 14,84	155,90 ± 21,14	107,40 ± 9,42	175,90 ± 28,95*	106,40 ± 12,58	122,20 ± 18,40
N-6609	250,90 ± 47,48	198,80 ± 23,12	357,00 ± 46,59	228,90 ± 18,65*	251,95 ± 47,30	185,42 ± 34,51
N-6709	11,65 ± 4,49	12,13 ± 4,81	23,47 ± 6,45	5,90 ± 1,67*	10,92 ± 4,40	13,16 ± 4,33
N-7006	44,35 ± 13,95	87,17 ± 19,89	28,05 ± 7,20	84,73 ± 11,93	24,55 ± 5,41*	84,70 ± 24,00*
N-7010	27,57 ± 7,10	26,02 ± 4,88	9,77 ± 3,18 [#]	35,65 ± 7,76*	16,07 ± 7,31	15,98 ± 7,87
N-7104	350,70 ± 22,54	341,97 ± 17,34	288,58 ± 17,59	309,98 ± 35,97	285,60 ± 16,37 [#]	333,44 ± 26,76
N-7201	46,42 ± 3,30	62,72 ± 6,46*	47,17 ± 1,79	53,32 ± 5,76	55,85 ± 5,85	47,52 ± 6,51
N-7301	160,20 ± 36,90	201,28 ± 37,53	256,30 ± 11,94 [#]	202,85 ± 44,00	237,90 ± 23,74	216,16 ± 57,70
N-7402	13,00 ± 3,78	23,08 ± 5,72	26,95 ± 3,32	26,17 ± 4,36	13,87 ± 5,86	18,70 ± 6,38
N-7406	16,90 ± 3,21	40,05 ± 5,84*	23,48 ± 3,66	57,72 ± 7,29*	14,35 ± 4,33	32,10 ± 9,43
N-7701	14,73 ± 3,36	17,10 ± 5,78	30,87 ± 3,91 [#]	11,08 ± 2,79*	10,88 ± 3,66	15,52 ± 5,38
N-7703	87,98 ± 11,74	62,60 ± 23,64	103,50 ± 17,00	57,42 ± 9,85*	64,08 ± 7,54	49,96 ± 9,14
N-7902	9,37 ± 2,98	13,23 ± 2,81	19,85 ± 2,08 [#]	14,53 ± 3,55	15,52 ± 5,07	14,02 ± 4,12
N-8007	30,25 ± 3,73	29,95 ± 8,02	17,55 ± 6,65	23,22 ± 5,38	11,20 ± 6,07 [#]	28,56 ± 14,41
N-8014	13,77 ± 2,64	7,567 ± 3,76	12,70 ± 5,78	3,15 ± 3,15	3,03 ± 3,03 [#]	13,44 ± 8,23

Tabla 34: Continuación

F344 y Lewis NAcc (Continuación)						
D. O. Normalizada						
Nº Punto	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
N-8202	509,87 ± 68,63	725,42 ± 8,98	588,70 ± 56,37	1080,00 ± 172,9*	653,80 ± 28,92	833,34 ± 130,13
N-8404	10,43 ± 2,20	30,40 ± 3,63*	12,05 ± 2,92	29,98 ± 8,81	25,18 ± 14,17	65,50 ± 20,26
N-8410	31,73 ± 5,94	2,68 ± 1,75*	32,12 ± 4,15	2,05 ± 1,39*	35,80 ± 6,75	2,98 ± 1,87*
N-8411	399,70 ± 71,62	489,20 ± 74,59	469,20 ± 30,39	438,90 ± 101,30	452,80 ± 42,96	226,20 ± 70,62* [#]
N-8601	91,00 ± 8,59	141,10 ± 17,41*	161,98 ± 37,56	189,92 ± 21,52	113,30 ± 13,52	183,60 ± 27,37*
N-8902	15,20 ± 2,52	16,06 ± 2,87	23,27 ± 5,88	9,82 ± 2,31	7,02 ± 1,48 [#]	11,20 ± 5,29
N-9104	174,02 ± 32,39	238,65 ± 43,65	176,18 ± 30,79	144,53 ± 32,95	105,70 ± 24,78	180,60 ± 20,14* [#]
N-9106	110,80 ± 19,39	148,48 ± 22,97	165,40 ± 8,88 [#]	143,03 ± 24,58	149,13 ± 24,55	201,42 ± 24,60
N-9401	23,75 ± 2,92	3,05 ± 1,05*	24,17 ± 5,61	16,83 ± 14,83	13,82 ± 5,78	14,82 ± 11,00
N-9505	197,30 ± 24,19	272,90 ± 53,43	270,60 ± 19,30 [#]	177,20 ± 32,06*	207,80 ± 39,70	247,50 ± 64,30

En la figura 37 se muestra un gel representativo de las proteínas extraídas de NAcc. En dicho gel se han marcado las proteínas que mostraron diferencias significativas en las comparaciones anteriormente detalladas.

De entre todas las proteínas cuya densidad óptica varió significativamente, se seleccionaron aquellas en las que la variación de la densidad óptica fue al menos 1,5 veces superior al comparar un grupo con otro. En total se seleccionaron 55 proteínas. Finalmente, se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 14 proteínas. Dichas proteínas se han señalado en color verde en el gel de la figura 37. Los datos de espectrometría de masas que sirvieron para la identificación de dichas proteínas se muestran en la tabla 35. En la figura 38 se representa gráficamente la densidad óptica de las proteínas identificadas.

A modo de resumen, en la tabla 36 se recogen las proteínas identificadas, indicando las comparaciones en las que mostraron diferencias significativas y, en esos casos, el ratio de variación.

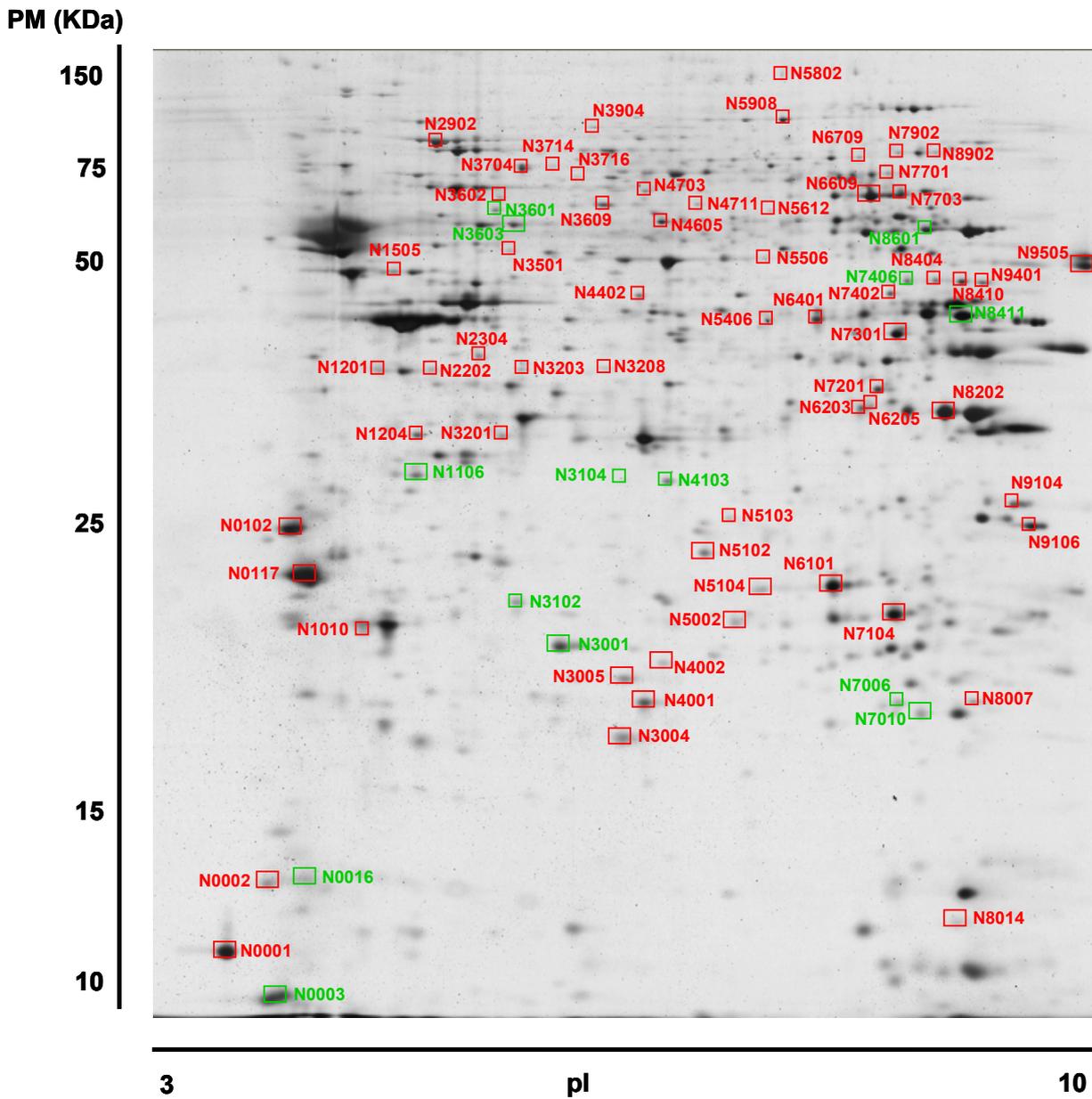


Figura 37: Gel bidimensional representativo de las proteínas del NAcc de animales F344 y Lewis. Las proteínas marcadas mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos y las señaladas en color verde se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 35: Proteínas del NAcc de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas. PM: Peso molecular; pl: Punto isoeléctrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot. *Código de las proteínas tomado de la base de datos del NCBI

N° Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados	Péptidos Secuencia MS/MS
N-0003	ATP sintasa, subunidad δ	gi 149034586*	14301	5,16	243	24	3	ANLEKAQSELSGADEAAR AQSELSGADEAAR IEANEALVK
N-0016	Proteína Irf1	Q6NYB8	47598	5,63	64	20	11(65)	
N-1106	μ -cristalina	Q9QYU4	33704	5,34	69	28	10(57)	
N-3001	Peroxirredoxina 6	O35244	24860	5,64	134	83	16(104)	
N-3102	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 3	gi 149022594*	34734	5,52	50	14	1	VVAEPVELAQEFR
N-3104	Anexina A3	P14669	36528	6,04	123	21	3	GTINNYPGFNPSVDAEAIR NLRDDISSETSGDFR LTFDEYR
N-3601	Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2 (DRP-2)	P47942	62638	5,95	113	27	12(27)	
N-3603	Proteína de choque térmico de 60 KDa	P63039	58061	5,35	177	41	24(65)	
N-4103	Proteína de transferencia del fosfatidilinositol	P16446	32115	5,97	61	36	10(44)	
N-7006	Citocromo b-c1, subunidad Rieske	P20788	28712	9,04	107	31	12(65)	
N-7010	Superóxido dismutasa 2	P07895	24887	8,96	19	3	1	NVRPDYLK
N-7406	Fumarato hidratasa 1	Q5M964	54715	8,88	83	15	2	AAAEVNQEYGLDPK IYELAAGGTAVGTGLNTR
N-8411	Citrato sintasa	Q8VHF5	52176	8,53	158	32	22(65)	
N-8601	ATP-sintasa, subunidad α	P15999	55361	8,28	192	50	25(65)	

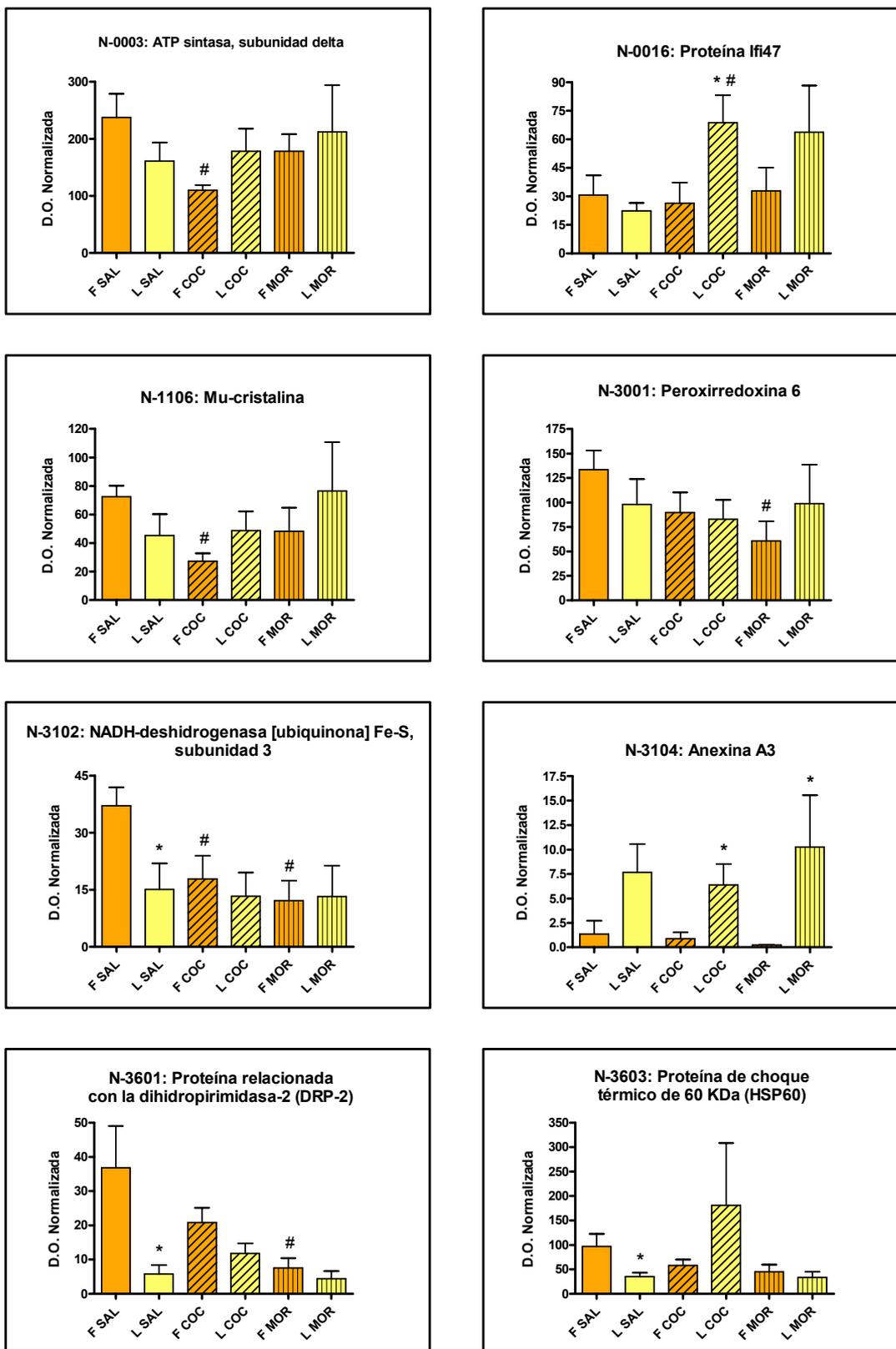


Figura 38: Expresión de las proteínas del NAcc de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D:O.) normalizada \pm E.S.M. F SAL: F344 + Salino; L SAL: Lewis + Salino; F COC: F344 + Cocaína; L COC: Lewis + Cocaína; F MOR: F344 + Morfina; L MOR: Lewis + Morfina. * vs F344; # vs Salino. (n=6 para todos los grupos, excepto L MOR: n=5)

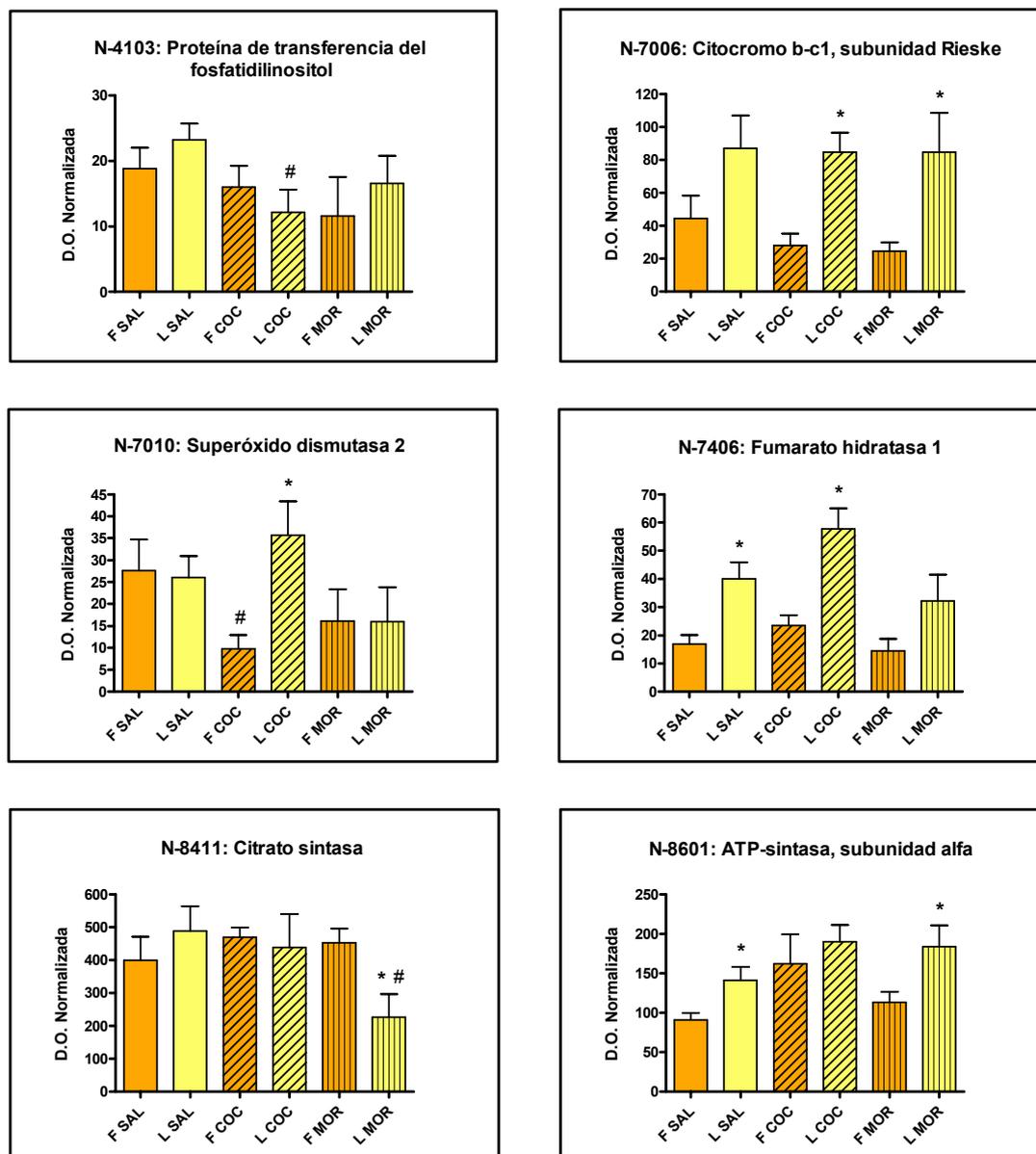


Figura 38: Continuación

Tabla 36: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas del NAcc de las ratas F344 y Lewis. F SAL: F344 + Salino; F + MOR: F344 + Morfina; F COC: F344 + Cocaína; L SAL: Lewis + Salino; L MOR: Lewis + Morfina; L COC: Lewis + Cocaína. n.s. diferencia no significativa en la comparación de estos grupos.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Ratio densidades ópticas normalizadas						
		LSAL/ FSAL	LCOC/ FCOC	LMOR/ FMOR	FCOC/ FSAL	LCOC/ LSAL	FMOR/ FSAL	LMOR/ LSAL
N-0003	ATP sintasa, subunidad δ	n.s.	n.s.	n.s.	0,46	n.s.	n.s.	n.s.
N-0016	Proteína Ifi47	n.s.	2,61	n.s.	n.s.	2,66	n.s.	n.s.
N-1106	μ-cristalina	n.s.	n.s.	n.s.	0,38	n.s.	n.s.	n.s.
N-3001	Peroxirredoxina 6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,45	n.s.
N-3102	NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, subunidad 3	0,41	n.s.	n.s.	0,48	n.s.	0,32	n.s.
N-3104	Anexina A3	n.s.	7,21	46,54	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
N-3601	Proteína relacionada con la dihidropirimidasa -2 (DRP-2)	0,16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,21	n.s.
N-3603	Proteína de choque térmico de 60 KDa	0,36	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
N-4103	Proteína de transferencia del fosfatidilinositol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,52	n.s.	n.s.
N-7006	Citocromo b-c1, subunidad Rieske	n.s.	3,02	3,45	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
N-7010	Superóxido dismutasa 2	n.s.	3,65	n.s.	0,35	n.s.	n.s.	n.s.
N-7406	Fumarato hidratasa 1	2,37	2,46	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
N-8411	Citrato sintasa	n.s.	n.s.	0,50	n.s.	n.s.	n.s.	0,46
N-8601	ATP-sintasa, subunidad α	1,55	n.s.	1,62	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Para validar los datos de expresión proteica obtenidos en análisis proteómico del NAcc se analizó mediante Western-Blot la expresión de una de las proteínas en las que se obtuvieron variaciones significativas en los ensayos de electroforesis bidimensional. Para ello se eligió la proteína DRP-2, ya que su expresión varió significativamente en varias de las comparaciones realizadas en este estudio. Además, como se ha comentado anteriormente, esta proteína también mostró variaciones significativas en los animales procedentes de los ensayos de CPP. Otra razón que nos hizo elegirla es el hecho de que en la bibliografía se pueden encontrar estudios en los que se relacionan las variaciones en la expresión de la DRP-2 con la exposición a drogas de abuso (Taylor y col., 2007; Faure y col., 2009; Kobeissy y col., 2010). En concreto, en este estudio la DRP-2 mostró diferencias significativas en su expresión cuando se compararon los grupos F SAL frente a L SAL y F SAL frente a F MOR; los ensayos de Western-Blot confirmaron estas diferencias (tabla 37, figura 39).

Tabla 37: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de DRP-2 en el NAcc de ratas F344 y Lewis. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. del ratio de las densidades ópticas de la proteína DRP-2 y β -actina (DRP-2/ β -actina). F SAL: F344 + Salino; F + MOR: F344 + Morfina; L SAL: Lewis + Salino; L MOR: Lewis + Morfina.

GRUPO	RATIO DENSIDADES ÓPTICAS DRP-2/ β -ACTINA (u.a)
F SAL	1,4180 \pm 0,3068
F MOR	0,6553 \pm 0,1428
L SAL	0,5555 \pm 0,0566
L MOR	0,6630 \pm 0,0838

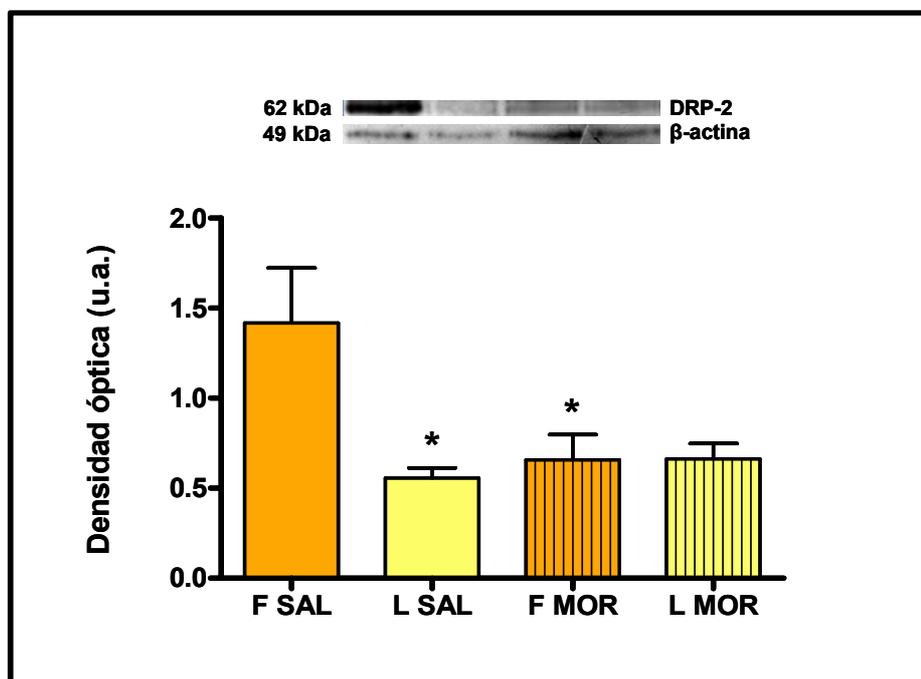


Figura 39: Resultados obtenidos mediante Western Blot en la expresión de DRP-2 en el NAcc de ratas F344 y Lewis. Las barras representan la media \pm E.S.M. de la densidad óptica. * $p < 0,05$ respecto a la densidad óptica del grupo F SAL. En la parte superior se muestra un ejemplo representativo del marcaje de la DRP-2 y de la β -actina, que se utilizó como control de carga. F SAL: F344 + Salino, $n=4$; F MOR: F344 + Morfina, $n=4$; L SAL: Lewis + Salino, $n=4$; L MOR: Lewis + Morfina, $n=4$.

Para estudiar las diferencias en la expresión de las proteínas a nivel basal, se establecieron comparaciones entre los grupos **F SAL** y **L SAL**. De todas las proteínas que variaron su expresión significativamente se consiguió identificar 5 (figura 38): la ATP5a1, la subunidad 3 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S, la fumarato hidratasa, la DRP-2 y la HSP-60. Todas ellas se habían detectado previamente en los estudios con animales procedentes del CPP de cocaína o del CPP de morfina, a excepción de la subunidad 3 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S; si bien en los estudios de CPP se detectaron otras subunidades de dicha proteína.

La ATP5a1, o subunidad α de la ATP sintasa, forma parte del núcleo catalítico CF(1) de las ATP-sintasas de la clase F, las cuales transforman el ADP en ATP al final de la fosforilación oxidativa (Lee y col., 1990). La expresión de esta enzima disminuyó en los animales F344 con respecto a los Lewis, siendo esta disminución significativa tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con morfina (figura 38, N-8601). Esta observación se puede relacionar con los resultados obtenidos en el modelo de extinción del CPP. Así, en el NAcc de animales procedentes del CPP de cocaína esta enzima

mostró también diferencias significativas en las comparaciones NE SAL vs E SAL y NE COC vs ECOC. Por otro lado, la subunidad γ de la ATP sintasa varió significativamente al comparar los NAcc de animales NE SAL y E SAL del CPP de morfina. En todos los casos los animales que no extinguieron la conducta de búsqueda de la droga mostraron menores niveles de esta proteína. Por lo que, atendiendo a este resultado se podría establecer un paralelismo entre las ratas F344 y los animales NE. Como se ha detallado en apartados anteriores, diversos autores han descrito que la exposición a drogas de abuso produce alteraciones en la expresión cerebral de la ATP5a1 y de otras subunidades de la ATP sintasa, tanto en animales como en humanos (Bierczynska-Krzysik y col., 2006, Sari y col., 2010; Tannu y col., 2007). Todas estas evidencias indican que esta proteína podría ser considerada como un posible marcador de vulnerabilidad al consumo de drogas de abuso, y que su nivel de expresión estaría inversamente relacionado con dicha vulnerabilidad.

La subunidad 3 de la NADH-deshidrogenasa [ubiquinona] Fe-S forma parte del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y también participa en la fosforilación oxidativa (Talpade y col., 2000). En condiciones basales la expresión de esta proteína fue mayor en las ratas F344 que en las Lewis; sin embargo el tratamiento con cocaína o con morfina redujo la expresión de esta proteína en las ratas F344 hasta igualarla a la de las Lewis (figura 38, N-3102), por lo que esta proteína puede actuar como marcador de respuesta diferencial entre estas cepas para ambas drogas. Otras subunidades de esta enzima también variaron significativamente al comparar los animales NE SAL y E SAL, tanto del CPP de cocaína como del CPP de morfina. En este caso, y al igual que en las ratas F344, en los animales que no extinguieron la preferencia por la droga se detectaron mayores niveles de esta enzima. Si unimos nuestros datos a los descritos en la literatura, que demuestran que, las drogas de abuso producen alteraciones en la expresión de esta proteína, podríamos considerar que los niveles de expresión de esta enzima están relacionados con la vulnerabilidad a la drogadicción.

La fumarato hidratasa es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la conversión de fumarato en malato en la matriz mitocondrial (McGrath, 2003). Como puede observarse en la figura 38 (N-7406). Los animales de la cepa Lewis poseen mayores niveles de esta proteína que las ratas F344 independientemente de la droga que se administre y esta diferencia resulta significativa tanto a nivel basal como tras la administración de cocaína. También detectamos esta proteína en el NAcc de los animales del CPP de cocaína, ya que en el grupo E SAL obtuvimos una mayor expresión de la fumarato hidratasa con

respecto al NE SAL. Por lo que podría pensarse que esta proteína es un buen marcador de vulnerabilidad diferencial a los efectos de las drogas.

La DRP-2 participa en el desarrollo de los axones (Cole y col., 2006) y su expresión se ve modificada por la exposición a diferentes drogas de abuso (Li y Wang, 2007). El patrón de expresión de esta proteína en las cepas de este estudio resulta llamativo, ya que en condiciones basales las ratas F344 tienen unos niveles de expresión muy superiores a los de las Lewis; sin embargo cuando estos animales son tratados con cocaína o morfina la expresión de la DRP-2 se reduce hasta ser similar a la de las Lewis (figura 38, N-7406), por lo que esta proteína sería un buen marcador de respuesta diferencial a ambas drogas. Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación de la DRP-2, es necesaria para la elongación del axón (Cole y col., 2006). En este sentido, la expresión de la forma fosforilada de la DRP-2 fue mayor en el NAcc de los animales NE SAL con respecto a los E SAL del CPP de cocaína. Por lo que podría decirse que los animales F344 son parecidos a los NE en cuanto a la expresión de la DRP-2.

La proteína HSP-60 pertenece al grupo de proteínas de respuesta a estrés (Latchman, 2004). En el modelo de extinción de la preferencia de cocaína los animales NE presentaron una mayor expresión de esta proteína que los E, si bien este incremento sólo fue significativo cuando los animales fueron tratados con cocaína. En condiciones basales las ratas F344 también mostraron un aumento significativo de la HSP-60 con respecto a las ratas Lewis pero, en este caso, la diferencia dejó de ser significativa al tratar a los animales con las drogas. Además, hay que señalar que la cocaína aumentó la expresión de esa proteína en las ratas Lewis por encima de la de las F344, si bien este aumento no fue significativo (figura 38, N-3603). Por lo que en este caso resulta más difícil establecer un paralelismo con los datos procedentes de los estudios de CPP.

En la comparación **F COC y L COC** se consiguió identificar correctamente 5 proteínas que presentaron diferencias significativas en su expresión (figura 38). Para todas ellas la expresión fue mayor en el grupo L COC. Éstas proteínas fueron: fumarato hidratasa 1, subunidad Rieske del citocromo b-c1, anexina A3, IFI47 (del inglés, *47kDa Interferon-gamma-inducible factor*) y superóxido dismutasa 2. Estas proteínas podrían ser un marcador de respuesta diferencial entre ambas razas a los efectos de la cocaína, lo que podría traducirse en la aparición de alteraciones más importantes en la fisiología del sistema cerebral de refuerzo, y por lo tanto en una mayor susceptibilidad de las ratas Lewis a los efectos de la cocaína.

La subunidad Rieske del citocromo b-c1, es una de las subunidades del complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Iwata y col., 1998). Los animales F344 presentaron una menor expresión de esta proteína con respecto a los Lewis, esta disminución se hizo significativa cuando los animales recibieron la administración de cocaína o de morfina (figura 38, N-7006); por lo que esta proteína también puede ser un marcador de respuesta diferencial al opiáceo. De acuerdo con este dato, en el ensayo del CPP de morfina, la expresión de la subunidad 1 de este citocromo fue también menor en los animales NE SAL con respecto a los E SAL.

La familia de las anexinas comprende un grupo de proteínas que son capaces de unirse a iones de Ca^{2+} y a los fosfolípidos. Participan en el tráfico y en la regulación de la formación de la membrana (Gerke y Moss, 2002). En la bibliografía se recoge que la expresión de la anexina A5 se ve influenciada por la administración de nicotina, alcohol y morfina (Li y Wang, 2007). En nuestro trabajo, la anexina A3 muestra diferencias significativas entre las dos cepas de animales en estudio tras la administración de cocaína o morfina (figura 38, N-3104); por este motivo, cabría hipotetizar sobre su implicación en la vulnerabilidad al abuso a sustancias adictivas. Sin embargo, esta proteína no se detectó en ninguno de los ensayos de CPP.

Las proteínas superóxido dismutasa 2 e IFI47 pueden resultar de mayor interés ya que sus niveles basales fueron semejantes en ambos grupos de animales (figura 38, N-7010, N-0016). Además, y como se observa en la figura 38, la expresión de la superóxido dismutasa 2 sufre una regulación totalmente distinta y contraria entre las razas en estudio, de tal modo que las ratas Lewis aumentan significativamente su expresión respecto a las F344, mientras que estas últimas la disminuyen, respecto a sus niveles basales. Todo ello, podría sugerir que esta proteína es un marcador diferencial entre las razas respecto a su comportamiento cuando son tratadas con cocaína.

La superóxido dismutasa 2 es un enzima antioxidante especializada en la eliminación de radicales del anión súperoxido (Miao y St Clair, 2009). En pacientes con esquizofrenia producida por metaanfetamina se ha postulado sobre una posible asociación entre un polimorfismo del gen de la súperoxido dismutasa 2 y el riesgo de padecer dicha enfermedad (Nakamura y col., 2006). Además, estudios recientes, afirman que el polimorfismo de esta enzima también está relacionado con la pérdida de materia gris en el cerebro de alcohólicos (Srivastava y col., 2010). En los ensayos de condicionamiento espacial no detectamos esta proteína, aunque sí otras enzimas antioxidantes.

En la comparación de los grupos **F MOR y L MOR**, además de la ATP5a1 y de la subunidad Rieske del citocromo b-c1, comentadas previamente, se detectaron variaciones en la expresión de la citrato sintasa. Esta enzima participa en el primer paso del ciclo de Krebs, catalizando la reacción del oxalacetato y el acetil CoA para formar citrato y coenzima A. La citrato sintasa tiene una notable importancia biológica, puesto que permite la completa regulación del ciclo de Krebs, ya que actúa como una especie de “marcapasos” del mismo (Goncalves y col., 2010). El nivel de esta enzima fue menor en las ratas L MOR tanto al compararlas con las F344 como con su salino (figura 38, N-8411), por lo que esta proteína, se podría considerar como un marcador diferencial entre ratas Lewis y F344, al menos en su respuesta a los efectos de la morfina. En este sentido, se ha descrito un aumento en la expresión de esta proteína en el hipocampo de ratas tratadas con alcohol durante 8 semanas, lo cual se ha relacionado con la diferencia en la vulnerabilidad al consumo de esta droga (Hargreaves y col., 2009).

Como ya se comentó con anterioridad, el resto de comparaciones, aunque se realizaron, a nuestro entender son menos importantes desde el punto de vista de la búsqueda de posibles marcadores de vulnerabilidad a los efectos de las drogas. Si bien estas comparaciones se describen a continuación.

Para estudiar la respuesta a morfina y cocaína dentro la misma cepa se analizaron las comparaciones F SAL vs F COC, L SAL vs L COC, F SAL vs F MOR, y L SAL vs L MOR. Las variaciones obtenidas en la expresión de las proteínas reflejan exclusivamente lo ocurrido en el NAcc tras la exposición aguda a las drogas en estudio. Tan solo comentaremos las proteínas que no habían sido objeto de comentario hasta el momento y que tienen relación con los resultados obtenidos en los ensayos de CPP.

El tratamiento con cocaína disminuyó significativamente la expresión de la subunidad δ de la ATP sintasa en los animales F344 con respecto a su salino (figura 38, N-0003). Como se ha comentado, la subunidad α de esta proteína se detectó en los estudios de preferencia espacial a cocaína.

Por otro lado, el tratamiento con morfina redujo significativamente la expresión de la enzima antioxidante peroxirredoxina-6 en ratas F344 respecto a las que se trataron con salino (figura 38, N-3001). La expresión de peroxirredoxina-5 también fue menor en el grupo NE MOR con respecto al NE SAL del CPP de morfina; lo cual implica nuevas similitudes entre las ratas F344 y los animales que no extinguieron la preferencia por la droga.

La peroxirredoxina-6 pertenece a la familia de las peroxirredoxinas, enzimas antioxidantes que controlan también los niveles de peróxidos inducidos por citoquinas (Rhee y col., 2005). Un gran número de proteínas de esta familia son reguladas por la acción de las drogas de abuso (para revisión consultar Li y Wang, 2007). En muestras de NAcc de humanos que murieron por sobredosis de cocaína (Tannu y col., 2007), así como en el de monos *rhesus* tras ser adiestrados para la autoadministración, se ha encontrado una reducción en la expresión de la PRDX-2. Además, esta proteína también mostró diferencias en su expresión en el NAcc e hipocampo de ratas con preferencia innata al consumo de alcohol (Witzmann y col., 2003).

En conjunto, los resultados obtenidos en el análisis del NAcc de ratas F344 y Lewis nos permiten llegar a una serie de conclusiones. Por un lado, parece llamativo el hecho de que en las proteínas detectadas en las comparaciones F COC vs L COC y F MOR vs L MOR se haya encontrado en su mayoría (6 de las 8 proteínas) una mayor expresión en las ratas Lewis. Según los datos existentes en la bibliografía, las ratas F344 parecen adquirir conductas de búsqueda de drogas en menor medida que las Lewis, pero una vez desarrolladas son las ratas F344 las que las mantienen por más tiempo; este parámetro reflejaría mejor la vulnerabilidad a la adicción que la adquisición rápida de las conductas de búsqueda, por tanto, podríamos suponer que estas proteínas se constituirían como marcadores de “protección” contra el desarrollo de la adicción a drogas. Por otro lado, de las 14 proteínas detectadas en este estudio, 8 ya habían sido identificadas en los ensayos de condicionamiento espacial o eran isoformas o subunidades de proteínas ya identificadas en dichos ensayos. Además, para 5 de estas proteínas, pudo establecerse un paralelismo entre ratas F344 y animales NE por un lado, y entre ratas Lewis y animales E por otro. Este paralelismo sería compatible con la teoría que acabamos de exponer que indica que las ratas F344 son más vulnerables que las Lewis a los efectos adictivos de las drogas de abuso.

3.3.2. Análisis proteómico de la CPF de ratas F344 y Lewis.

Después de la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional y tras su tinción con nitrato de plata se obtuvieron geles en los que se pueden observar una serie de puntos que corresponden al mapa proteico de la corteza prefrontal de las ratas F344 y Lewis (ver un ejemplo en la figura 40). Para la detección, emparejamiento y análisis de la densidad óptica de los puntos se utilizó el programa PD-Quest 8.0.1. La tabla 38 muestra para cada grupo experimental la media del número de puntos detectados.

Tabla 38: Puntos detectados para cada grupo experimental tras la obtención de geles de la CPF de animales F344 y Lewis. F SAL: F344 + Salino; F MOR: F344 + Morfina; F COC: F344 + Cocaína; L SAL: Lewis + Salino; L MOR: Lewis + Morfina; L COC: Lewis + Cocaína. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M.

GRUPO	n	Puntos detectados
F SAL	5	725,6 \pm 114,10
F MOR	6	943,2 \pm 92,43
F COC	6	832,2 \pm 94,61
L SAL	6	832,3 \pm 83,68
L MOR	5	860,0 \pm 105,90
L COC	6	989,7 \pm 120,10

En la tabla 39 se muestran todas las proteínas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 39: Proteínas de la CPF de animales F344 y Lewis cuya expresión varió significativamente al comparar los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de la densidad óptica (D.O.) normalizada de cada proteína. F SAL: F344 + Salino; L SAL: Lewis + Salino; F COC: F344 + Cocaína; L COC: Lewis + Cocaína; F MOR: F344 + Morfina; L MOR: Lewis + Morfina. * $p < 0,05$ vs F344; # $p < 0,05$ vs SAL; n.d.: proteína no detectada. (n=6 para todos los grupos excepto para L MOR: n=5)

N° Punto	F344 y Lewis CPF					
	D.O. normalizada					
	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
C-0121	44,54 \pm 27,82	39,30 \pm 9,18	41,42 \pm 5,83	0,72 \pm 0,72	75,45 \pm 17,42	19,40 \pm 9,74*
C-1122	4,320 \pm 3,056	12,55 \pm 4,89	8,53 \pm 5,99	2,72 \pm 2,72	23,48 \pm 7,78	0,63 \pm 0,20
C-1304	13,92 \pm 0,85	20,78 \pm 9,10	31,23 \pm 6,17#	10,92 \pm 5,86*	32,08 \pm 11,03	47,26 \pm 23,64
C-1606	6,54 \pm 1,54	20,15 \pm 5,26*	8,18 \pm 1,20	13,48 \pm 3,52	11,20 \pm 3,28	14,54 \pm 3,89
C-2304	31,16 \pm 2,80	28,47 \pm 5,21	35,68 \pm 8,51	28,53 \pm 10,61	32,15 \pm 1,47	18,58 \pm 4,22*
C-2503	21,04 \pm 7,24	28,22 \pm 15,07	29,57 \pm 10,83	13,47 \pm 2,69	30,35 \pm 4,03	14,44 \pm 3,20*
C-3203	33,98 \pm 3,55	29,53 \pm 4,13	28,80 \pm 3,11	43,25 \pm 4,75*	32,90 \pm 3,54	34,12 \pm 1,87
C-3402	27,18 \pm 6,09	19,33 \pm 6,31	14,93 \pm 5,07	9,07 \pm 4,64	9,13 \pm 2,19#	11,96 \pm 7,53
C-3709	4,86 \pm 1,93	13,97 \pm 4,35	14,12 \pm 2,91#	10,57 \pm 2,53	8,83 \pm 2,14	12,34 \pm 4,27
C-4105	1,54 \pm 0,70	7,35 \pm 2,95	4,27 \pm 1,51	14,15 \pm 2,52*	6,03 \pm 1,28#	14,42 \pm 1,87*
C-4403	40,30 \pm 5,29	33,03 \pm 3,21	40,03 \pm 6,15	44,78 \pm 1,78#	40,72 \pm 2,16	39,44 \pm 3,11
C-4501	26,24 \pm 5,25	31,53 \pm 4,34	24,13 \pm 2,92	49,90 \pm 8,76*	29,27 \pm 3,86	31,62 \pm 4,54
C-4610	1,84 \pm 0,76	1,45 \pm 0,70	2,77 \pm 1,38	5,70 \pm 1,24#	3,67 \pm 1,02	3,84 \pm 1,65
C-4801	2,00 \pm 0,77	4,53 \pm 0,72*	2,18 \pm 1,11	4,78 \pm 1,35	2,83 \pm 0,73	3,58 \pm 1,15
C-5105	85,54 \pm 9,41	62,23 \pm 15,49	84,78 \pm 13,68	112,70 \pm 5,66#	82,18 \pm 4,13	89,26 \pm 5,63

Tabla 39: Continuación

N° Punto	F344 y Lewis CPF (Continuación)					
	D. O. Normalizada					
	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
C-5403	9,20 ± 4,75	17,03 ± 5,75	24,92 ± 4,56	9,32 ± 3,59*	7,88 ± 5,04	30,34 ± 9,25
C-5413	0,06 ± 0,06	n.d.	3,67 ± 2,54	3,35 ± 2,97	2,73 ± 1,05 [#]	5,67 ± 1,82
C-5506	19,82 ± 2,53	21,95 ± 4,08	19,15 ± 2,79	28,82 ± 2,33*	20,03 ± 1,62	23,18 ± 3,57
C-5507	17,78 ± 7,58	15,00 ± 5,76	22,95 ± 4,98	38,98 ± 5,37 [#]	14,08 ± 5,69	32,84 ± 3,28 [#]
C-5509	1,58 ± 0,49	6,67 ± 1,25*	n.d.	9,93 ± 0,59	4,02 ± 2,48	8,94 ± 1,20
C-5602	27,56 ± 3,20	24,12 ± 2,30	25,95 ± 3,98	32,85 ± 1,46 [#]	27,67 ± 1,44	27,04 ± 7,295
C-5910	1,00 ± 0,59	2,25 ± 0,53	1,63 ± 1,26	0,62 ± 0,31 [#]	1,95 ± 1,49	1,40 ± 1,40
C-6102	38,24 ± 4,89	81,87 ± 13,00*	33,37 ± 4,62	105,60 ± 6,77 ^{**}	39,22 ± 2,39	87,10 ± 4,90*
C-6104	34,16 ± 5,25	30,22 ± 2,79	38,05 ± 7,18	44,48 ± 4,47 [#]	39,45 ± 5,63	42,42 ± 7,24
C-6106	51,46 ± 7,84	46,22 ± 8,02	54,50 ± 15,85	71,45 ± 4,54 [#]	50,25 ± 6,51	52,94 ± 5,48
C-6207	31,30 ± 3,69	28,87 ± 2,19	22,33 ± 4,51	36,43 ± 1,42*	27,45 ± 1,88	33,80 ± 2,18
C-6303	5,64 ± 2,60	5,57 ± 2,04	10,03 ± 2,77	11,77 ± 3,06	12,04 ± 0,87	12,04 ± 0,87 [#]
C-6406	21,68 ± 9,98	17,42 ± 7,72	29,23 ± 13,09	45,40 ± 5,92 [#]	19,38 ± 8,95	34,16 ± 7,750
C-6508	7,06 ± 4,24	17,80 ± 5,82	7,45 ± 3,15	20,23 ± 4,04*	6,08 ± 2,51	15,24 ± 4,97
C-7110	254,10 ± 42,06	329,77 ± 88,39	447,00 ± 125,22	430,15 ± 14,61	400,50 ± 34,76 [#]	294,90 ± 51,20
C-7505	21,02 ± 10,24	3,70 ± 2,70	19,60 ± 6,63	1,68 ± 1,68*	16,72 ± 7,10	n.d.
C-7508	17,46 ± 6,55	14,95 ± 3,93	22,85 ± 5,50	31,38 ± 1,96 [#]	24,62 ± 2,04	14,50 ± 6,04

Tabla 39: Continuación

	F344 y Lewis CPF (Continuación)					
	D. O. Normalizada					
Nº Punto	F SAL	L SAL	F COC	L COC	F MOR	L MOR
C-7511	34,94 ± 5,48	20,05 ± 1,85*	44,95 ± 8,86	49,65 ± 16,95	39,48 ± 7,12	63,84 ± 18,99 [#]
C-7605	16,48 ± 3,04	16,45 ± 2,47	16,53 ± 4,38	25,22 ± 2,60 [#]	20,48 ± 2,18	16,74 ± 4,61
C-8603	23,38 ± 1,26	23,87 ± 1,94	27,52 ± 7,41	34,52 ± 3,10 [#]	29,05 ± 2,63	27,80 ± 2,42
C-9301	32,08 ± 7,08	24,62 ± 2,06	22,57 ± 8,24	49,92 ± 8,94 [#]	45,98 ± 14,14	21,84 ± 9,38

En la figura 40 se muestra un gel representativo de las proteínas extraídas de CPF. En dicho gel se han marcado las proteínas que mostraron diferencias significativas en las comparaciones anteriormente detalladas.

De entre todas las proteínas cuya densidad óptica varió significativamente, se seleccionaron aquellas en las que la variación de la densidad óptica fue al menos 1,5 veces superior al comparar un grupo con otro. En total se seleccionaron 50 proteínas. Finalmente se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 15 proteínas. Dichas proteínas se han señalado en color verde en el gel de la figura 40. Los datos de espectrometría de masas que sirvieron para la identificación de dichas proteínas se muestran en la tabla 40. En la figura 41 se representa gráficamente la densidad óptica de las proteínas identificadas.

A modo de resumen, en la tabla 41 se recogen las proteínas identificadas, indicando las comparaciones en las que mostraron diferencias significativas y, en esos casos, el ratio de variación.

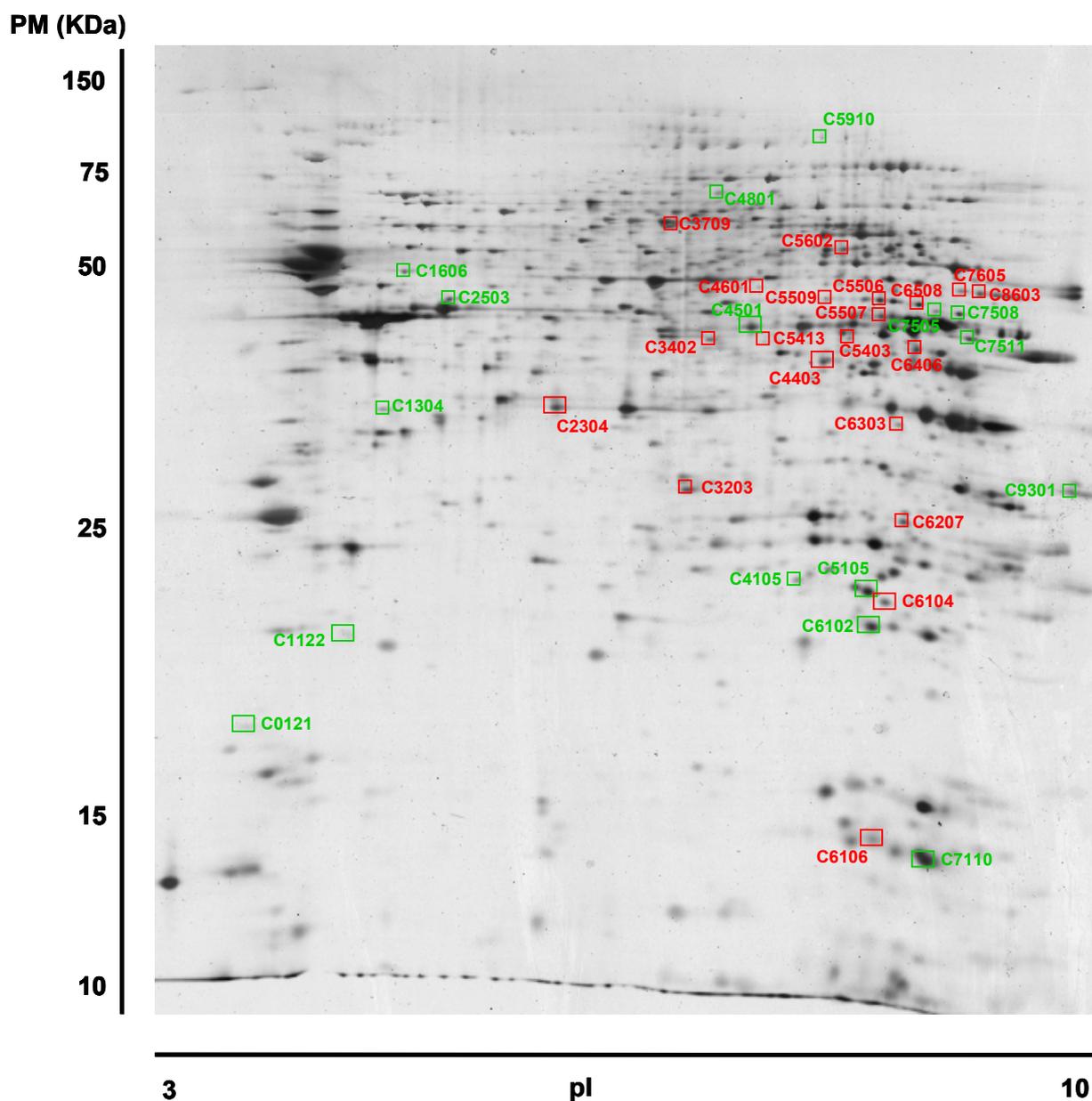


Figura 40: Gel bidimensional representativo de las proteínas de la CPF de animales F344 y Lewis. Las proteínas marcadas mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos y las señaladas en color verde se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 40: Proteínas de CPF de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas. PM: Peso molecular; pl: Punto isoeléctrico. Código de las proteínas tomado de la base de datos Swiss-Prot. *Código de las proteínas tomado de la base de datos del NCBI.

Nº Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Código proteína	PM teórico (Da)	pl teórico	Score	Coverage (%)	Péptidos emparejados	Péptidos Secuencia MS/MS
C-0121	Cadena β -2C de la tubulina	Q6P9T8	50225	4,79	52	25	9	
C-1122	Peroxirredoxina-2	P35704	21941	5,34	136	63	12	
C-1304	μ -cristalina	Q9QYU4	33704	5,34	79	31	10	
C-1606	Proteína fibrilar ácida de la glia	P47819	49984	5,35	397	79	37	
C-2503	Mezcla (Guanina deaminasa/Creatina quinasa B)	Q9WTT6/ P07335	51554/ 42983	5,56/ 5,39	413/ 103	60/ 28	29/ 9	
C-4105	Glutation S-transferasa α -4	P14942	25550	6,77	28	5	1	KPPPDG HYVDVVR
C-4501	Glutamina sintetasa	P09606	42982	6,64	280	59	29	
C-4801	Proteína con dominio WD-1	Q5RKI0	66824	6,15	62	22	11	
C-5105	Citocromo b-c1, subunidad Rieske	P20788	29712	9,04	146	38	16	
C-5910	Dinamina-1	P21575	97576	6,44	137	15	4	SSVLENFVGRDFLPR GISPVPINLR KFFLSHPSYR TSGNQDEILVIR
C-6102	Mezcla (Adenilato quinasa isoenzima 1/ Proteína 3 similar al factor de ribosilación del ADP)	P39069/ P37996	21684/ 20615	7,66/ 6,74	100/ 51	60/ 49	11/ 6	
C-7110	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	P10111	18091	8,34	93	75	11	
C-7505	Mezcla (Precursor mitocondrial de la fumarato hidratasa/ Isoforma CRA_b de la fosfodiesterasa 1 nucleótidos ciclícos)	P14408/ gi 149054231*	54714/ 45227	9,06/ 8,60	204	44/ 34	13/ 10	
C-7508	Mezcla (ATPasa 1/Citrato Sintasa)	A0JPJ7/ Q8VHF5	44792/ 52176	7,62/ 8,53	326/ 153	45/ 25	3	GGDGLKPPPIIGR FYHDWWDKEIEVLNK FYHDWWDKEIEVLNK
C-7511	Mezcla (Precursor mitocondrial de Acetil-CoA acetiltransferasa/ Fructosa-bisfosfato aldolasa A)	P17764/ P05065	45009/ 39783	8,92/ 8,31	165	40/ 35	14/ 10	

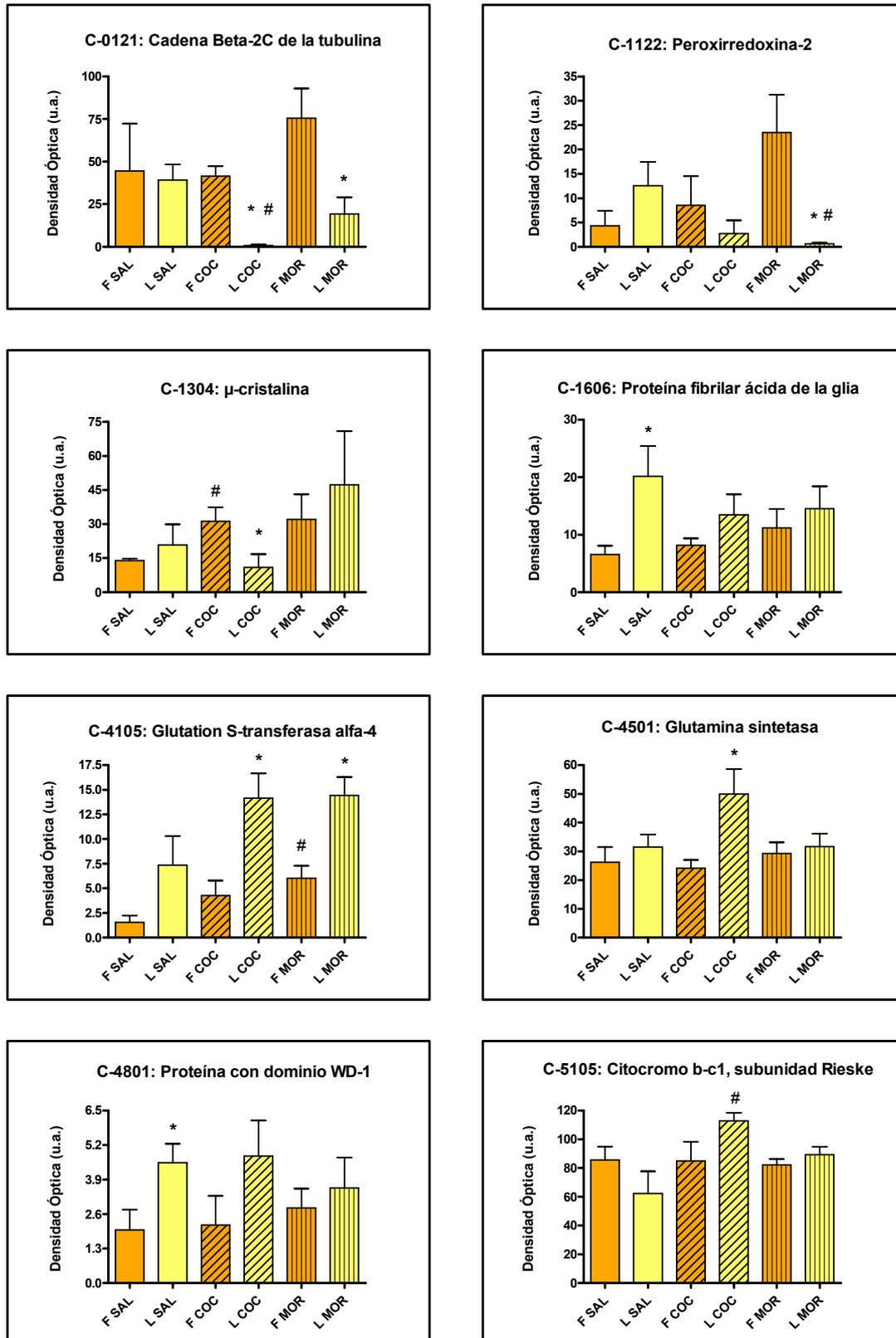


Figura 41: Expresión de las proteínas de la CPF de ratas F344 y Lewis identificadas por espectrometría de masas. Las barras representan la media de la densidad óptica (D.O.) normalizada \pm E.S.M. F SAL: F344 + Salino; L SAL: Lewis + Salino; F COC: F344 + Cocaína; L COC: Lewis + Cocaína; F MOR: F344 + Morfina; L MOR: Lewis + Morfina. * vs F344; # vs Salino. (n=6 para todos los grupos excepto para L MOR: n=5)

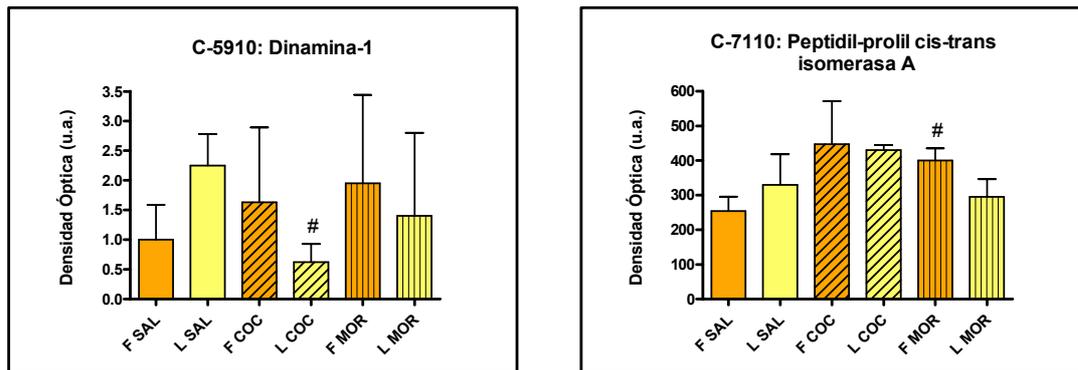


Figura 41: Continuación

Tabla 41: Ratios de las densidades ópticas normalizadas de las proteínas identificadas de la CPF de las ratas F344 y Lewis. F SAL: F344 + Salino; F + MOR: F344 + Morfina; F COC: F344 + Cocaína; L SAL: Lewis + Salino; L MOR: Lewis + Morfina; L COC: Lewis + Cocaína. n.s. diferencia no significativa en la comparación de estos grupos.

N° Punto	NOMBRE PROTEÍNA	Ratio densidades ópticas normalizadas						
		LSAL/ FSAL	LCOC/ FCOC	LMOR/ FMOR	FCOC/ FSAL	LCOC/ LSAL	FMOR/ FSAL	LMOR/ LSAL
C-0121	Cadena β -2C de la tubulina	n.s.	n.s.	0,26	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C-1122	Peroxirredoxina-2	n.s.	n.s.	0,02	n.s.	n.s.	n.s.	0,05
C-1304	μ -cristalina	n.s.	0,35	n.s.	2,24	n.s.	n.s.	n.s.
C-1606	Proteína fibrilar ácida de la glia	3,08	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C-4105	Glutation S-transferasa α -4	n.s.	3,31	2,40	n.s.	n.s.	3,92	n.s.
C-4501	Glutamina sintetasa	n.s.	2,07	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C-4801	Proteína con dominio WD-1	2,27	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C-5105	Citocromo b-c1, subunidad Rieske	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1,81	n.s.	n.s.
C-5910	Dinamina-1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,27	n.s.	n.s.
C-7110	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1,58	n.s.

Como se detalló anteriormente, los ensayos realizados con las cepas de ratas F344 y Lewis nos sirvieron para obtener información sobre las diferencias en su proteoma, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con cocaína o morfina. Además, con estos experimentos se intentó también encontrar correlaciones con los resultados obtenidos en los ensayos de condicionamiento espacial. Por tanto, en la discusión de los resultados describiremos las similitudes encontradas con los ensayos de CPP.

Para obtener diferencias significativas en la expresión de las proteínas a nivel basal, se establecieron comparaciones entre los grupos **F SAL y L SAL**. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de varias proteínas, de las cuales se consiguió identificar correctamente por espectrometría de masas 2 de ellas: la proteína fibrilar ácida de la glia (PFAG) y la proteína con dominio WD-1.

La PFAG es el marcador principal de astrocitos de forma que, ante cualquier deterioro del tejido nervioso, los astrocitos reaccionan produciendo lo que se denomina astrogliosis reactiva (Eng y col., 2000). El nivel de expresión de la PFAG fue mayor en las ratas Lewis que en las F344 en condiciones basales; sin embargo, la administración de morfina o cocaína redujo la expresión de la PFAG en las ratas Lewis hasta igualarla a la de las F344 (figura 41, C-1606). Estas observaciones coinciden con las descritas por Beitner-Jonshon y col. (1993) que también detectaron mayores niveles de PFAG, en condiciones basales, en el ATV de ratas Lewis que en ratas F344. Además, existen estudios en los que se relaciona la acción de las drogas de abuso con cambios en la expresión de esta proteína. Por ejemplo, se ha descrito que el tratamiento crónico con morfina aumenta la expresión de la PFAG en el ATV de la rata (Beitner-Jonshon y col. 1993). Este incremento también se produce en el estriado y la corteza cerebral de ratas sometidas a test de autoadministración con metanfetamina (Krasnova y col., 2010). Finalmente, hay que recordar que en nuestros ensayos de condicionamiento espacial con morfina detectamos una reducción de la expresión de la PFAG en la comparación NE MOR vs NE SAL, si bien resulta difícil relacionar este dato con los obtenidos en ratas F344 y Lewis.

La proteína con dominio WD-1 presentó mayor expresión en las ratas Lewis que en las F344, si bien ese incremento sólo fue significativo en condiciones basales (figura 41, C-4801). Esta proteína induce el desensamblaje de los filamentos de actina en colaboración con la familia de las cofilinas (UniProtKB/Swiss-Prot, 2010). Teniendo en cuenta este hecho, podemos establecer alguna relación con los datos obtenidos en el ensayo de CPP de morfina, ya que en él detectamos una mayor expresión de cofilina-1 en los animales E SAL con respecto a los NE SAL.

En la comparación realizada entre los grupos **F COC** y **L COC** se encontraron diferencias significativas en diversas proteínas de las cuales se identificaron correctamente cuatro: glutamina sintetasa, glutathion S-transferasa α -4, cadena β -2C de la tubulina y μ -cristalina (figura 41).

La glutamina sintetasa metaboliza el glutamato en glutamina (Wu y col., 2007). La transmisión glutamatérgica es crítica para una transmisión sináptica normal y contribuye al desarrollo del sistema nervioso y a la plasticidad sináptica. En lo referente a la transmisión glutamatérgica y la adicción a drogas, como se ha detallado en la Introducción, es clave en procesos como la sensibilización conductual, la extinción de la conducta de búsqueda de la droga y las recaídas (Tzschentke y Schmidt, 2004; Uys y LaLumiere, 2008; Peters y col., 2009); por lo que es presumible que la glutamina sintetasa pueda estar involucrada en los efectos de las drogas de abuso. Así, en 1989 Ledig y colaboradores, observaron una disminución de la actividad de la glutamina sintetasa en el cerebro de crías de ratas sometidas al consumo de alcohol durante la gestación o la lactancia. Posteriormente, trabajos realizados en cerebro de ratas Wistar tratadas crónicamente con alcohol, confirmaron dicho descenso en la actividad de la proteína (Babu y col., 1994); y, en estudios realizados en la médula espinal de ratas que presentaron tolerancia a la morfina, también se encontró una disminución en la expresión de la glutamina sintetasa (Wu y col., 2007). Además, en nuestros ensayos de CPP con morfina también detectamos una disminución de la expresión de esta proteína en el NAcc de los animales NE MOR con respecto a los NE SAL. A la vista de todos estos datos, parece evidente la participación de la glutamina sintasa en los procesos implicados en la adicción. En el caso concreto del presente estudio, y debido a que la administración de cocaína produce en las ratas Lewis una sobreexpresión de dicha proteína (figura 41, C-4501), se la podría considerar como un posible marcador del desarrollo temprano de la conducta adictiva inducida por el psicoestimulante.

La proteína glutathion S-transferasa α -4 conjuga el glutathion con metabolitos reactivos, entre los que se encuentran productos del estrés oxidativo (Parraga y col., 1998). En las ratas Lewis la expresión de esa proteína es mayor que en las F344 en condiciones basales, aunque esa diferencia sólo se hace significativa cuando los animales son tratados con las drogas en estudio (figura 41, C-4105); por lo que esta proteína podría considerarse como un marcador de respuesta diferencial a las drogas en estas cepas. Por otro lado, en los ensayos del CPP de cocaína, encontramos una disminución en la expresión de la subunidad ω -1 de esta proteína al comparar los grupos NE SAL y E SAL, por lo que en este caso no se cumple el paralelismo NE-F344, postulado previamente.

La cadena β -2C de la tubulina forma parte de los microtúbulos y, por lo tanto, interviene en la formación del citoesqueleto. La buena dinámica tubular es esencial para la correcta viabilidad de la célula (Cheng y col., 2003). En lo que se refiere a su relación con las drogas, se ha observado una disminución en la expresión de filamentos de tubulina en células fetales del cortex cerebral incubadas con cocaína (Lee y col., 2009); y, de manera semejante, en el estriado de ratas tratadas crónicamente con morfina (Marie-Claire y col., 2004). En nuestros experimentos, la administración de cocaína prácticamente inhibió la expresión de la cadena β -2C de la tubulina en ratas Lewis, mientras que apenas la modificó en las ratas F344 (figura 41, C-0121). La morfina, sin embargo, no fue tan eficaz como la cocaína para disminuir la expresión de la cadena β -2C de la tubulina en las ratas Lewis, aunque aparecieron diferencias significativas entre las dos razas de ratas al producirse una mayor expresión en las F344. La expresión de esta proteína, nos podría estar reflejando una mayor susceptibilidad a los efectos tóxicos de la cocaína por parte de las ratas Lewis.

Finalmente, la administración de cocaína también redujo significativamente la expresión de la μ cristalina en la cepa Lewis con respecto a la F344 (figura 41, C-1304). Esta proteína parece estar implicada en la regulación de la concentración extracelular de la hormona tiroidea triyodotironina (UniProtKB-SwisProt, 2010). En relación con las drogas de abuso, sólo hemos encontrado en la bibliografía un estudio en el que se ha descrito un aumento de la $\alpha\beta$ -cristalina en la amígdala de la rata tras la administración de morfina (Przewlocki, 2004). Este dato puede coincidir con nuestros resultados ya que la morfina produjo un aumento de la expresión de esta proteína en las dos cepas con respecto a su salino, si bien este aumento no es significativo.

En la comparación de los grupos **F MOR** y **L MOR** se identificaron correctamente tres proteínas: la cadena β -2C de la tubulina, la glutatión S-transferasa α -4, que ya se han comentado previamente en otras comparaciones de este apartado, y la PRDX-2.

En apartados anteriores se ha comentado la implicación de las proteínas de la familia de las peroxirredoxinas con las drogas de abuso. En este caso observamos que la administración de las drogas produjo un efecto opuesto respecto a la expresión de la PRDX-2 en las dos cepas utilizadas en el estudio: aumentó la expresión en las ratas F344 y la redujo en las Lewis, si bien esas variaciones sólo implicaron diferencias significativas entre las dos cepas tras el tratamiento con morfina (figura 41, C-1122). Estos resultados muestran un cierto paralelismo con los resultados obtenidos en el ensayo de preferencia espacial inducida por morfina. En dicho ensayo la expresión de

esta proteína fue mayor en las ratas NE SAL que en las E SAL; por lo que, según la expresión de esta proteína, se podría establecer, de nuevo, el paralelismo entre los animales F344 y los que no extinguen la conducta de búsqueda de morfina.

Para estudiar la respuesta a cocaína y morfina dentro la misma cepa se analizaron las comparaciones F SAL vs F COC, L SAL vs L COC, F SAL vs F MOR, y L SAL vs L MOR. Las variaciones obtenidas en la expresión de las proteínas reflejan exclusivamente lo ocurrido en la CPF tras la exposición aguda a las drogas en estudio; por lo que sólo comentaremos el caso de la dinamina-1, ya que se detectó en los ensayos de CPP y no había sido objeto de comentario hasta el momento.

La dinamina-1 participa en la endocitosis de las vesícula sinápticas (Smillie y Cousin, 2005), además, algunos estudios han sugerido una relación funcional entre estas proteínas y el citoesqueleto de actina (Lee y De Camilli, 2002). El tratamiento con cocaína de las ratas de la cepa Lewis produjo un descenso en la expresión esta proteína (figura 41, C-5910). Además, en nuestros ensayos de CPP de morfina detectamos una disminución en la expresión de esta proteína al comparar los grupos NE MOR y EMOR. En cerebro de ratas tratadas con nicotina se encontraron cambios en la expresión de la dinamina-1 (Hwang y Li, 2006). En el estriado de ratas tratadas con morfina de forma crónica se detectó una disminución de la expresión de esta proteína (Bierczynska-Krzysik y col., 2006). A la vista de los antecedentes expuestos es evidente la implicación de la dinamina en los procesos biológicos que desencadenan las drogas de abuso. Por otra lado, y considerando la más que posible relación funcional entre las dinaminas y el citoesqueleto, es necesario destacar que la administración de cocaína en ratas Lewis redujo la expresión tanto de la dinamina -1 como de la cadena β -2 de la tubulina. Lo que a nuestro a entender, además de apoyar dicha relación, valida nuestros resultados.

Para finalizar, hay que destacar que, como en el estudio del NAcc de ratas F344 y Lewis, en el estudio comparativo de la expresión proteica de la CPF de estos animales se detectaron muchas proteínas que ya se habían detectado en los ensayos de CPP (en concreto 5 proteínas de las 10 detectadas); si bien en este núcleo fue más difícil establecer correlaciones con los datos obtenidos en los estudios comportamentales.

3.3.3. Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas detectadas en el NAcc y la CPF de ratas F344 y Lewis.

De manera semejante al tratamiento de datos realizado con los estudios de condicionamiento espacial, empleamos el programa “Ingenuity Pathways Analysis” para identificar los mecanismos biológicos más implicados en la distinta respuesta a los efectos de las drogas que manifiestan las ratas Lewis y F344.

La comparación L SAL vs F SAL es la que más proteínas detectadas rinde. Estas proteínas están implicadas en los procesos de **producción de energía, comunicación y señalización celular, organización y ensamblaje celular y respuesta al estrés** (tabla 42; figura 42), si bien parece que la producción de energía es el proceso más implicado en las diferencias basales.

En la comparación L COC vs F COC se identificaron los mismos procesos biológicos que en las comparaciones basales, si bien en este caso todas las proteínas detectadas vieron aumentada su expresión en las ratas Lewis.. El tratamiento con morfina ofreció unos resultados semejantes, es decir, que de nuevo los animales de la raza Lewis expresaron mayores niveles de proteínas que las F344; si bien, en este caso sólo los procesos producción de energía y respuesta al estrés resultaron significativos.

Hay que destacar que estos resultados son muy similares a los del CPP en cuanto a los procesos biológicos implicados y en cuanto al patrón de cambios de las proteínas detectadas; ya que en también en este estudio se cumple que el tratamiento con la droga hace que en los individuos más vulnerables (en este caso las ratas F344) se reduzca la expresión de las proteínas que podrían estar implicadas en los procesos que regulan la vulnerabilidad a las drogas.

Tabla 42: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en ratas F344 y Lewis. Las proteínas marcadas en verde presentaron mayor expresión en los animales Lewis, las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en los animales F344. (n.s., proceso no significativo)

PROCESO BIOLÓGICO	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN RATAS F344 Y LEWIS		
	L SAL vs F SAL	L COC vs F COC	L MOR vs F MOR
Producción de energía	-ATP-sintasa subunidad α -Fumarato Hidratasa 1 - Proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP-60) -NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S proteína-3	-Fumarato Hidratasa 1 -Citocromo b-c1, subunidad Rieske	-ATP-sintasa subunidad α -Citocromo b-c1, subunidad Rieske
Comunicación y señalización celular	-Proteína Fibrilar Ácida de la Glia -Proteína relacionada con la dihidropirimidasa-2 (DRP-2) -Proteína de choque térmico de 60 kDa, (HSP-60)	-Glutamina sintetasa	(n.s.)
Organización y ensamblaje celular	-Proteína Fibrilar Ácida de la Glia -Proteína relacionada con la dihidropirimidasa-2 (DRP-2)	-Superóxido dismutasa 2 -Anexina A3	n.s.
Respuesta al estrés	-NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S proteína-3	-Superóxido dismutasa 2 -Glutation S-transferasa α -4	-Glutation S-transferasa α -4 -Ubiquinol citocromo c reductasa -Peroxirredoxina-2 (PRDX-2)

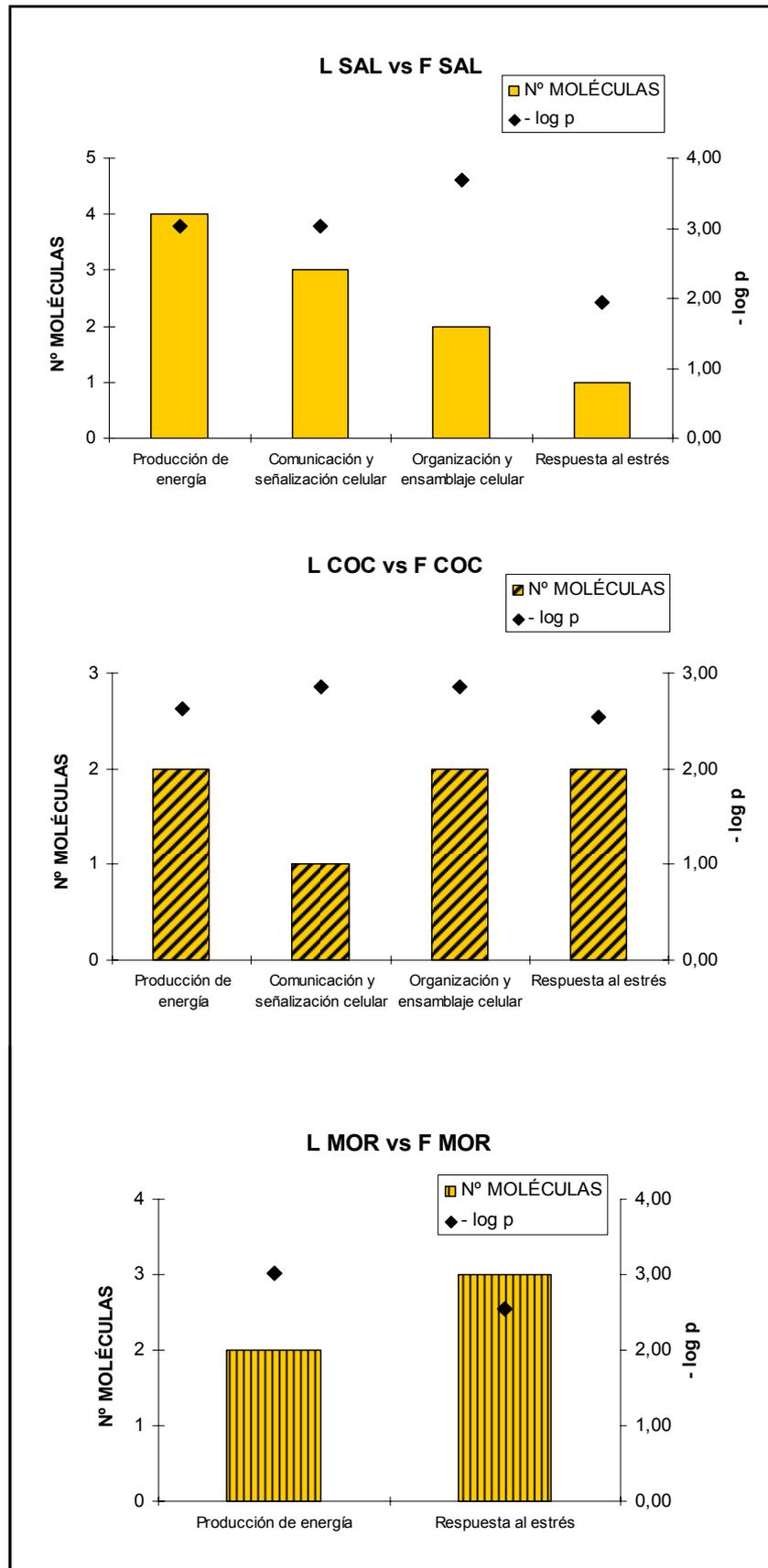


Figura 42: Procesos biológicos más significativos en los que participan las proteínas identificadas en ratas F344 y Lewis.

Abreviaturas de las proteínas incluidas en la figura 44**(Conexiones L SAL vs F SAL)**

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
AP2A1	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit
ATP5A1	ATP-sintasa subunidad α
ATP5D	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit
ATP5H	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d
ATP5J2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2
ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit s (factor B)
ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1
ATPAF2	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2
CRMP1	collapsin response mediator protein 1
DPYSL2	proteína relacionada con la dihidropirimidasa-2
FH	fumarato hidratasa 1
GFAP	proteína fibrilar ácida de la glia
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GRIN2A	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A
HSPD1	proteína de choque térmico de 60 kDa
INA	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha
MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
NDUFA9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9, 39kDa
NDUFS3	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S proteína-3
NDUFS4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NDUFS5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa
NEFL	neurofilament, light polypeptide
NEFM	neurofilament, medium polypeptide
PLD2	phospholipase D2
PPL	periplakin
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme
SKIV2L	superkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae)
SYVN1	synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin
TST	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)
WDR1	WD repeat domain 1

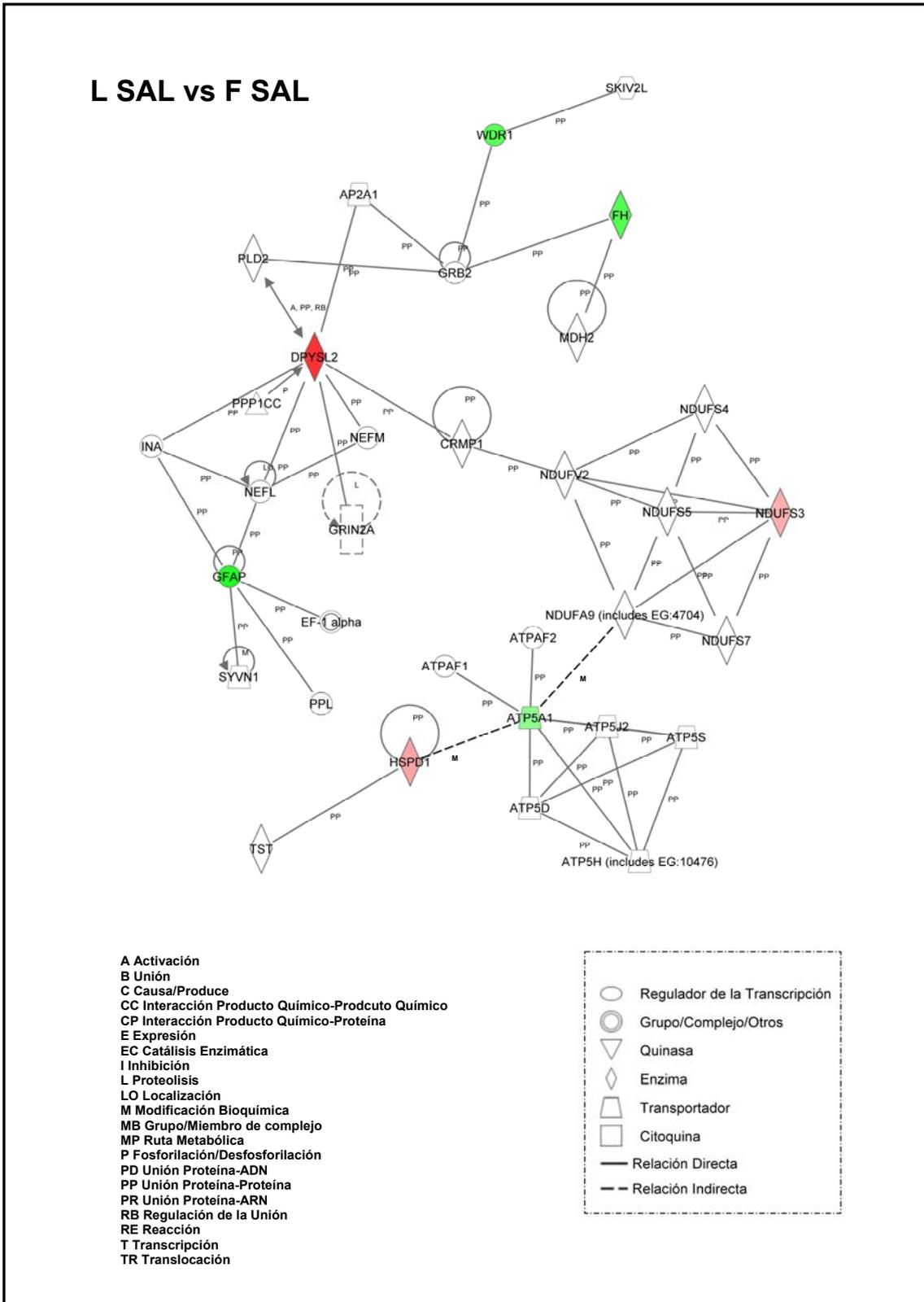


Figura 43: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación L SAL vs F SAL. Las moléculas marcadas en verde presentaron mayor expresión en el grupo L SAL y las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en el grupo F SAL. La intensidad del color de las proteínas indica en grado de regulación. Las proteínas en blanco no se detectaron en nuestro estudio. Las abreviaturas de los nombres de las proteínas de la figura se detallan en la página anterior.

**Abreviaturas de las proteínas incluidas en la figura 44
(Conexiones L COC vs F COC)**

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
ACPP	acid phosphatase, prostate
ADCY10	adenylate cyclase 10 (soluble)
ANXA3	anexina A3
APP	amyloid beta (A4) precursor protein
CBS	cystathionine-beta-synthase
CCDC92	coiled-coil domain containing 92
COLEC12	collectin sub-family member 12
CRYM	μ -cristalina
DYNC1LI1	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1
EMG1	EMG1 nucleolar protein homolog (S. cerevisiae)
FH	fumarato hidratasa 1
GCH1	GTP cyclohydrolase 1
GPR146	G protein-coupled receptor 146
GST	glutamina sintetasa
GSTA4	glutathion S-transferasa α -4
IFI47	interferon gamma inducible protein 47
IL1B	interleukin 1, beta
INHBE	inhibin, beta E
KCNN2	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2
LIPC	lipase, hepatic
MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
MT1E	metallothionein 1E
PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal
SOD2	superóxido dismutasa 2
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
UQCRFS1	ubiquinol citocromo c reductasa
ZNRF1	zinc and ring finger 1

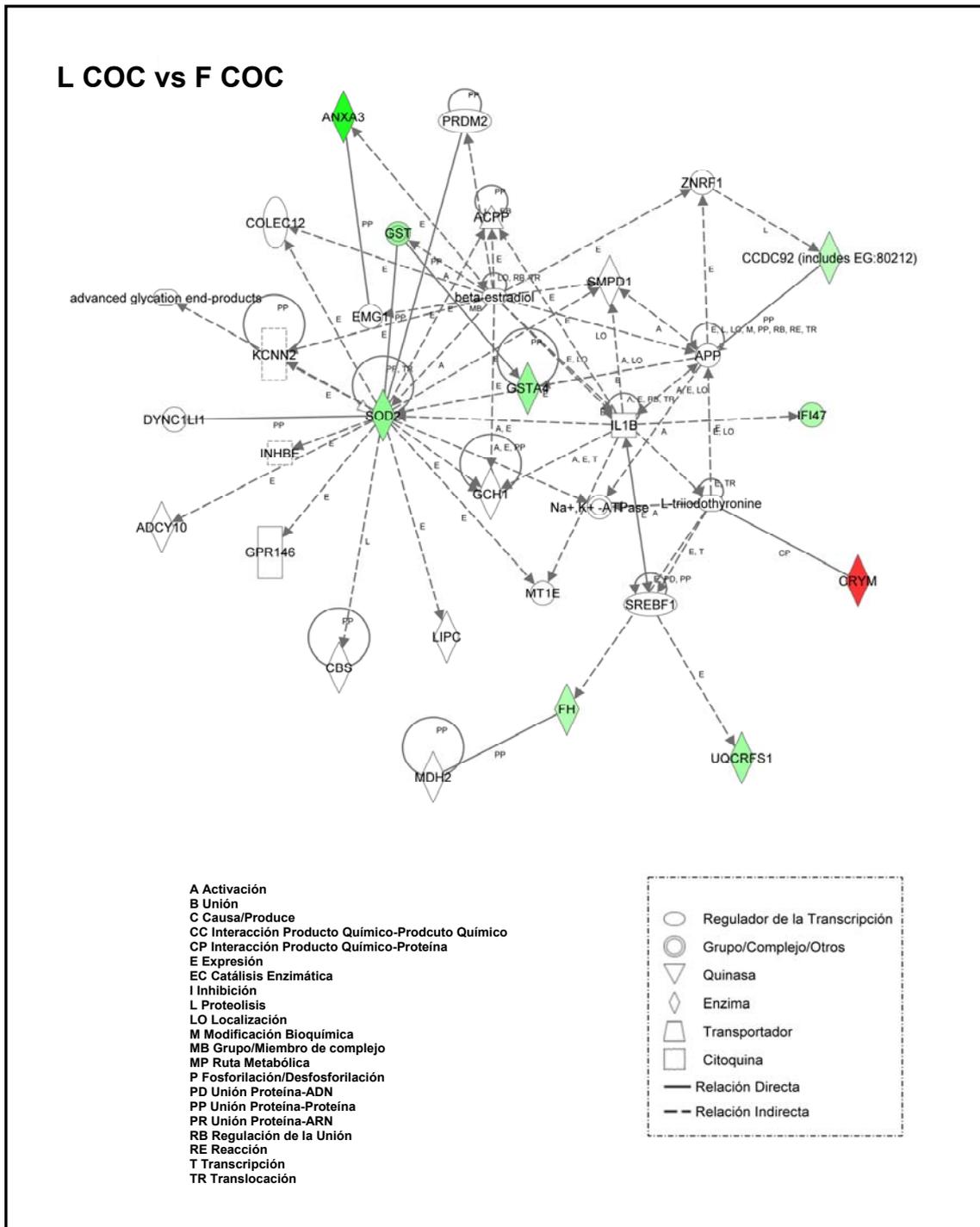


Figura 44: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación L COC vs F COC. Las moléculas marcadas en verde presentaron mayor expresión en el grupo L COC y las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en el grupo F COC. La intensidad del color del color de las proteínas indica en grado de regulación. Las proteínas en blanco no se detectaron en nuestro estudio. Las abreviaturas de los nombres de las proteínas de la figura se detallan en la página anterior.

**Abreviaturas de las proteínas incluidas en la figura 45
(Conexiones L MOR vs F MOR)**

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
ATP5A1	ATP-sintasa subunidad α
ATP5F1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1
ATP5I	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E
ATP5L	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit G
BMP7	bone morphogenetic protein 7
CDK9	cyclin-dependent kinase 9
CS	citrato sintetasa
CYC1	cytochrome c-1
GSTA4	glutation S-transferasa α -4
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9
NOTCH1	notch 1
PPARGC1B	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta
PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
TGFB1	transforming growth factor, beta 1
TUBA1A	tubulin, alpha 1a
TUBB2C	cadena β -2C de la tubulina
UQCRFS1	citocromo b-c1, subunidad Rieske
VCL	vinculin

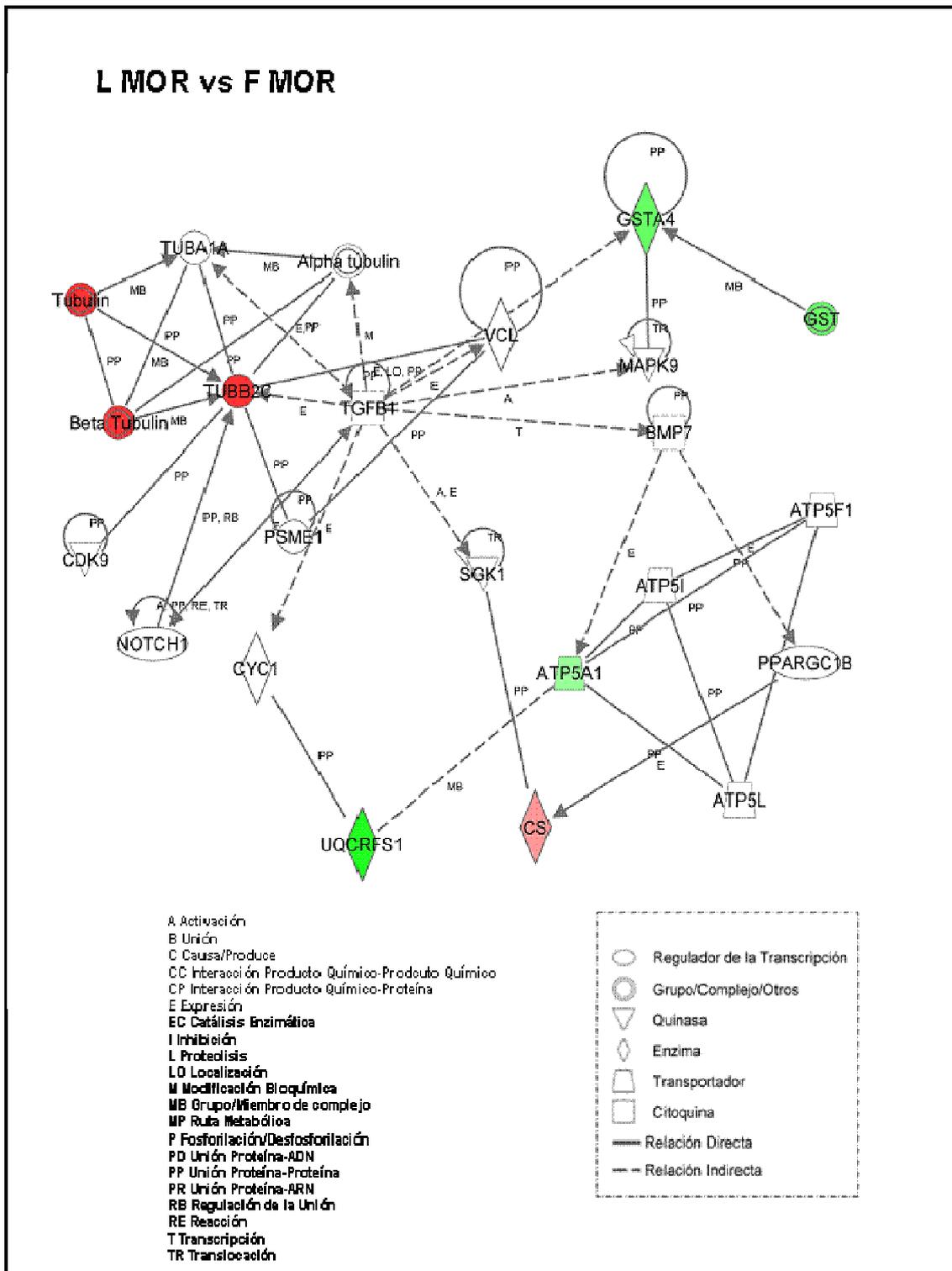


Figura 45: Representación gráfica de las conexiones entre las proteínas cuya expresión varió significativamente en la comparación L MOR vs F MOR. Las moléculas marcadas en verde presentaron mayor expresión en el grupo L MOR y las marcadas en rojo presentaron mayor expresión en el grupo F MOR. La intensidad del color de las proteínas indica el grado de regulación. Las proteínas en blanco no se detectaron en nuestro estudio. Las abreviaturas de los nombres de las proteínas de la figura se detallan en la página anterior.

V. DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis pretendimos avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la vulnerabilidad a la adicción a las drogas de abuso. Para ello empleamos dos modelos experimentales de vulnerabilidad diferencial, el de las ratas F344 y Lewis, ampliamente aceptado para este tipo de estudios; y otro, diseñado por nosotros, basado en el test del condicionamiento espacial. Son numerosos los trabajos existentes en la bibliografía que utilizan el paradigma del condicionamiento al sitio con el propósito, tanto de evaluar las propiedades reforzadoras de nuevas sustancias como de poder esclarecer los procesos biológicos implicados en la adicción a drogas. Para ello, solo hace falta comentar que son más de 250 los trabajos publicados en este último año, que han empleado el CPP como piedra angular de sus estudios. Por lo que, a pesar de las posibles limitaciones del test, parece evidente la utilidad del ensayo en el campo de las drogodependencias. En lo que respecta al diseño del protocolo de condicionamiento utilizado en este trabajo, se ha desarrollado por primera vez un test de extinción del comportamiento de búsqueda de la droga que nos ha permitido diferenciar dos poblaciones de animales con distinta vulnerabilidad a los efectos de la cocaína y la morfina.

La comparación del perfil de expresión proteica del NAcc y la CPF de animales procedentes de los dos modelos de vulnerabilidad diferencial, expuestos a cocaína o a morfina, nos ha permitido identificar una serie de procesos biológicos que se ven alterados en ambos modelos y con ambas drogas. Dichos procesos podrían influir en la susceptibilidad individual a los efectos adictivos de las drogas de abuso, e incluyen la fosforilación oxidativa, la respuesta al estrés, la organización y ensamblaje celular y la comunicación y señalización celular.

La fosforilación oxidativa tiene lugar en la mitocondria y en ella se produce energía en forma de ATP (Cheng y con., 2009). En nuestros estudios detectamos variaciones significativas en tres enzimas que participan en la fosforilación oxidativa. En concreto, en varias subunidades de la ATP sintasa, y de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona), y en el citocromo b-c1. Es importante destacar que todas las proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa que se identificaron en nuestros estudios, se detectaron tanto en los animales procedentes de los ensayos de CPP, como en el modelo de ratas F344 y Lewis; y que las variaciones observadas en su expresión siguieron la misma tendencia en los animales que no extinguieron la preferencia por la droga que en los animales F344. Esta observación podría confirmar el papel de dichas proteínas como biomarcadores de vulnerabilidad diferencial a la drogadicción. Otra consecuencia que se desprende de esta observación es que podría establecerse un paralelismo entre los animales que no

extinguen y las ratas F344, y, por ende, entre los animales que extinguen y las Lewis. Esta idea sería compatible con los datos existentes en la bibliografía que indican que, aunque las F344 parecen adquirir conductas de búsqueda de drogas más lentamente que las Lewis, una vez que la han desarrollado tardan más en extinguirla (Stephens y Riley, 2009).

Como se ha descrito en capítulos anteriores de esta memoria, muchas drogas de abuso alteran la expresión en el SNC de proteínas mitocondriales, incluidas las que participan en la fosforilación oxidativa (para revisión ver Li y Wang, 2007). El mecanismo a través del cual se producen estas alteraciones es difícil de dilucidar. Según algunos autores podría ser el resultado de las modificaciones producidas por la droga en la expresión génica de la mitocondria, lo cual se ha demostrado para la cocaína (Dietrich y col., 2004). También podría ser fruto de una acción directa de la dopamina, liberada por las drogas de abuso, sobre las enzimas mitocondriales. En este sentido, se ha descrito recientemente que la dopamina inhibe la actividad del complejo I mitocondrial (Brenner-Lavie y col., 2009).

Una de las consecuencias más importantes de la alteración de la fosforilación oxidativa es la generación de radicales libres de oxígeno (Brown y Yamamoto, 2003) que puede resultar en la aparición de estrés oxidativo. Para protegerse, la célula pone en marcha diferentes sistemas enzimáticos antioxidantes. En este sentido, hemos detectado en todos los modelos experimentales utilizados en nuestros estudios alteraciones en la expresión de enzimas antioxidantes, si bien no hay tantas coincidencias como en el caso de la fosforilación oxidativa. Por ejemplo, en los animales procedentes de los ensayos de CPP y en los estudios con ratas F344 y Lewis obtuvimos diferencias significativas en la expresión de varias isoformas de la glutatión transferasa y en varias proteínas de la familia de las peroxirredoxinas. Entre estas últimas destaca la PRDX-2, ya que se detectó en todos los modelos, si bien su posible papel como biomarcador de vulnerabilidad diferencial sólo parece claro en relación a los efectos de la morfina.

La inducción de estrés oxidativo en SNC se ha descrito en exposiciones a drogas de abuso como el alcohol (Sun y col., 2001), la morfina (Ozmen y col., 2007), la cocaína (Poon y col., 2007) o la anfetamina (Yamamoto y col., 2005). El SNC es especialmente susceptible al estrés oxidativo debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados. En este sentido, se ha demostrado que la cocaína aumenta la peroxidación lipídica (Kloss y col. 1984), y la producción de radicales libres de oxígeno en áreas que reciben proyecciones dopaminérgicas (Dietrich y col. 2005; Macedo y col.

2005). Lo cual podría deberse a que las neuronas dopaminérgicas son también muy sensibles al estrés oxidativo, ya que la propia dopamina y su metabolito, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) pueden oxidarse para producir quinonas reactivas y radicales libres de oxígeno que atacan directamente las proteínas neuronales (Hastings y col., Zigmond, 1994; Rabinovic y col., 2000). En este sentido, se ha sugerido que cuanto más eficiente sea el sistema antioxidante enzimático del individuo, menores serán los efectos disfóricos que le producirá la droga y mayor su tendencia a continuar en el consumo (Guindalini y col., 2005). Teniendo esto en cuenta, tiene sentido que hayamos detectado variaciones en la expresión de varias enzimas antioxidantes en nuestros modelos de vulnerabilidad diferencial.

Cuando los sistemas antioxidantes fallan o no son suficientes, los radicales libres pueden atacar al material genético, a los lípidos y a las proteínas celulares produciendo importantes alteraciones en la función y estructura celular (Butterfield, y col., 2002). El daño producido en dichas moléculas y los mecanismos de reparación subsiguientes pueden implicar alteraciones en proteínas relacionadas con los procesos de comunicación y señalización celular y de organización y ensamblaje celular. En nuestros estudios también encontramos proteínas encuadradas en dichos procesos en todos los modelos experimentales (por ejemplo, sinapsina-2, cofilina-1, dinamina-1, UCHL1, PFAF o MAP2K1). Estos procesos son más complejos que la fosforilación oxidativa o la respuesta al estrés oxidativo, y engloban una mayor variedad de proteínas, este hecho podría justificar que las proteínas coincidentes entre los diferentes modelos sean escasas. Entre ellas destacan las proteínas relacionadas con la dihidropirimidasa, que participan en el desarrollo del axón. La DRP-2, en concreto, se detectó en todos los modelos experimentales, aunque sólo puede relacionarse directamente con la vulnerabilidad diferencial en el modelo de animales F344-Lewis y en el del CPP de cocaína. En estos modelos, los animales NE SAL y F344 presentaron una mayor expresión al compararlos con los animales E SAL y Lewis, respectivamente; por lo que nuevamente se repite el paralelismo NE-F344 y E-Lewis que detectamos en la fosforilación oxidativa.

La alteración de los procesos biológicos mencionados podría finalmente resultar en modificaciones de la plasticidad neuronal que en los animales más vulnerables (NE y, posiblemente, F344) contribuirían a la persistencia de la conducta adictiva.

Es necesario recalcar que los resultados obtenidos con las técnicas de Proteómica deben ser validados en estudios comportamentales, en los que pueda comprobarse si la

inhibición o activación de las proteínas detectadas se traduce en alteraciones de la conducta adictiva. Esta validación es necesaria por varios motivos. Primero porque en muchos casos no sabemos cuál es el rango de variación de una proteína que debe considerarse como anormal, de forma que las alteraciones observadas, aunque sean estadísticamente significativas, pueden no tener ninguna trascendencia comportamental. Además, los estudios de Proteómica se centran fundamentalmente en variaciones cuantitativas en la expresión de las proteínas, las cuales no siempre están relacionadas con alteraciones en su actividad, especialmente en el caso de las enzimas. Y, finalmente, y más importante, porque los cambios en las proteínas identificadas pueden ser totalmente inespecíficos y no estar implicados en los procesos o las patologías estudiados. En este sentido, se sabe que hay ciertas proteínas que se detectan muy frecuentemente en estudios de Proteómica independientemente de las condiciones experimentales empleadas (Wang y col., 2009). No obstante, en nuestros estudios las proteínas que presentan un patrón de cambios idéntico en los diferentes modelos empleados (por ejemplo las implicadas en la fosforilación oxidativa), estarían fuera de sospecha y podrían considerarse buenos biomarcadores de vulnerabilidad diferencial a la adicción a drogas. No obstante, si bien somos conscientes de las limitaciones de la Proteómica, también sabemos que es un instrumento muy útil para tener una visión global de las proteínas y los procesos biológicos responsables de patologías complejas y multifactoriales, como las drogodependencias.

En resumen, en el presente trabajo el empleo de técnicas de Proteómica para el análisis de la expresión proteica cerebral en animales procedentes de dos modelos de vulnerabilidad diferencial a la adicción a cocaína o morfina, nos ha permitido identificar las proteínas, y los procesos biológicos en los que participan, que podrían influir en la susceptibilidad al desarrollo de una drogodependencia. Las proteínas identificadas en este estudio podrían utilizarse no sólo como biomarcadores de vulnerabilidad a las drogas de abuso, sino también como dianas terapéuticas para el tratamiento de la drogadicción.

VI. CONCLUSIONES

1. El protocolo de extinción del condicionamiento al sitio inducido por cocaína o morfina, y puesto a punto en esta Tesis, se ha constituido como una herramienta útil para la obtención de subpoblaciones de animales que difieren en su susceptibilidad a los efectos de las drogas de abuso.
2. La comparación del perfil de expresión proteica del NAcc y la CPF de animales procedentes de dos modelos de vulnerabilidad diferencial: el de la extinción del condicionamiento al sitio, y el de ratas F344 y Lewis, ha permitido identificar una serie de procesos biológicos que se ven alterados en ambos modelos antes y después de la exposición a cocaína y a morfina. Dichos procesos incluyen la fosforilación oxidativa, la respuesta al estrés, la organización y ensamblaje celular, y la comunicación y señalización celular.
3. Dentro de la fosforilación oxidativa se incluyen varias subunidades de la ATP sintasa, de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona) y del citocromo b-c1. Estas proteínas siguieron el mismo patrón de cambios en los animales que no extinguieron la preferencia por las drogas, con respecto a los que sí la extinguieron; que en las ratas F344 con respecto a las Lewis. Por lo que dichas proteínas podrían utilizarse como biomarcadores de vulnerabilidad diferencial a la drogadicción.
4. En relación con la respuesta al estrés destaca la PRDX-2, ya que se detectó en todos los modelos, si bien su posible papel como biomarcador de vulnerabilidad diferencial sólo parece claro en relación a los efectos de la morfina.
5. Entre las proteínas relacionadas con la organización y ensamblaje celular, la DRP-2 se detecta en todos los modelos; aunque sólo puede relacionarse directamente con la vulnerabilidad diferencial en el modelo de animales F344-Lewis y en el de la extinción de la preferencia al sitio inducida por cocaína.

6. Los animales que difieren en la velocidad de extinción del condicionamiento al sitio inducido por cocaína presentan además diferencias en la expresión de proteínas que participan en la glucólisis (como la enolasa), o en el ciclo de Krebs (como la fumarato hidratasa). Dichas proteínas podrían servir como marcadores específicos de vulnerabilidad a cocaína.
7. En los animales con distinto grado de extinción de la conducta de búsqueda de morfina se observan además diferencias en la expresión de proteínas que participan en el metabolismo de ácidos nucleicos, como la adenosilhomocisteinasa. Estas proteínas podrían considerarse biomarcadores específicos de vulnerabilidad a morfina.
8. La expresión de la proteína glutatión S-transferasa α -4 varía significativamente al comparar las ratas F344 y Lewis, independientemente de la droga administrada; por lo que podría considerarse como marcador genérico de la distinta vulnerabilidad a los efectos de las drogas en estas razas.
9. La comparación del patrón de cambios de las proteínas que se detectaron en los dos modelos de vulnerabilidad diferencial indica que, en nuestras condiciones experimentales, se podría establecer un paralelismo entre los animales que no extinguen la preferencia por la droga y las ratas F344, y entre los animales que sí la extinguen y las ratas Lewis.
10. Las proteínas identificadas en este trabajo, podrían emplearse en un futuro como marcadores de vulnerabilidad a drogas de abuso, o como dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos eficaces en el tratamiento de la adicción a estas sustancias. No obstante, dichas proteínas necesitarán ser validadas en modelos comportamentales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AEBERSOLD R., GOODELETT D.R. (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews* **101**: 269-295.
- AGUILAR M.A., RODRÍGUEZ-ARIAS M., MIÑARRO J. (2009) Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain research reviews* **59**: 253-277.
- AGUILAR-MAHECHA A., CANTIN C., O'CONNOR-MCCOURT M., NANTEL A., BASIK M. (2009) Development of reverse phase protein microarrays for the validation of clusterin, a mid-abundant blood biomarker. *Proteome Science* **7**: 15.
- ALEX P., GUCEK M., LI X. (2009) Applications of proteomics in the study of inflammatory bowel diseases: Current status and future directions with available technologies. *Inflammatory bowel diseases* **15**: 616-629.
- ALEXANDER-KAUFMAN K., JAMES G., SHEEDY D., HARPER C., MATSUMOTO I. (2006) Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. *Molecular psychiatry* **11**: 56-65.
- ALGUACIL L.F., PÉREZ-GARCÍA C., BOCOS C., TODA S. "Contribución de las nuevas técnicas genómicas y proteómicas al estudio de la patogenia de las enfermedades mentales y al desarrollo de la psicofarmacología" en "Historia de la Psicofarmacología". López-Múñoz F., Álamo C. Panamericana (2006) Madrid.
- AL-TARAWNEH S.K., BENCHARIT S. (2009) Applications of Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (SELDI-TOF) Mass Spectrometry in Defining Salivary Proteomic Profiles. *The open dentistry journal* **3**: 74-79.
- AMARA S.G., KUHAR M.J. (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annual review of neuroscience* **16**: 73-93.
- AMBROSIO E. "Bases biológicas de la dependencia de cocaína" en "Tratado SET de Transtornos Adictivos". Sociedad Española de Toxicomanías, Panamericana (2006), Madrid.
- AMBROSIO E. (2003) Vulnerabilidad a la drogadicción. *Adicciones* **15**: 187-190.
- AMBROSIO E., ALGUACIL L.F., IGLESIAS V., GARCÍA-LECUMBERRI C. y CRESPO J.A. (1995): Metodologías actuales para el estudio experimental de la drogadicción: una evaluación crítica. *Farmacología del SNC* **9**: 19-39.
- AMBROSIO E., ALGUACIL L.F., IGLESIAS V., GARCÍA-LECUMBERRI C. y CRESPO J.A. (1995): Metodologías actuales para el estudio experimental de la drogadicción: una evaluación crítica. *Farmacología del SNC* **9**: 19-39.
- ARNOLD J.C. (2005) The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **81**: 396-406.
- BABU P.P., KUMARI L.R., VEMURI M.C. (1994) Differential changes in cell morphology, macromolecular composition and membrane protein profiles of neurons and astrocytes in chronic ethanol treated rats. *Molecular and cellular biochemistry* **130**: 29-40.
- BACHER M., DEUSTER O., ALJABARI B., EGENSPERGER R., NEFF F., JESSEN F., POPP J., NOELKER C., REESE J.P., AL-ABED Y., DODEL R. (2010) The role of macrophage migration inhibitory factor in Alzheimer's disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **16**: 116-121.
- BACHER M., MEINHARDT A., LAN H.Y., DHABHAR F.S., MU W., METZ C.N., CHESNEY J.A., GEMSA D., DONNELLY T., ATKINS R.C., BUCALA R. (1998) MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **4**: 217-230.

- BÄCKSTRÖM P., HYYTIÄ P. (2007) Involvement of AMPA/kainate, NMDA, and mGlu5 receptors in the nucleus accumbens core in cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* **192**: 571-580.
- BALL M.S, KARUSO P. (2007) Mass spectral compatibility of four proteomics stains. *Journal of Proteome Research* **6**: 4313-4320.
- BALLESTEROS-YANEZ I., AMBROSIO E., PÉREZ J., TORRES I., MIGUÉNS M., GARCÍA-LECUMBERRI C., DEFELIPE J. (2008) Morphine self-administration effects on the structure of cortical pyramidal cells in addiction-resistant rats. *Brain research* **1230**: 61-72.
- BANTSCHIEFF M., BOESCHE M., EBERHARD D., MATTHIESON T., SWEETMAN G., KUSTER B. (2008) Robust and sensitive iTRAQ quantification on an LTQ Orbitrap mass spectrometer. *Molecular & cellular proteomics* **7**: 1702-1713.
- BARCELÓ-BATLLORI S., KALKO S.G., ESTEBAN Y., MORENO S., CARMONA M.C., GOMIS R. (2008) Integration of DIGE and bioinformatics analyses reveals a role of the antiobesity agent tungstate in redox and energy homeostasis pathways in brown adipose tissue. *Molecular & cellular proteomics* **7**: 378-393.
- BARDO M.T., ROWLETT J.K., HARRIS M.J (1995) Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **153**: 31-43.
- BASHKATOVA V., MEUNIER J., VANIN A. MAURICE T. (2006) Nitric oxide and oxidative stress in the brain of rats exposed in utero to cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1074**: 632-642.
- BASSAREO V., DE LUCA M.A., DI CHIARA G. (2007) Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology* **191**: 689-703.
- BASSAREO V., DI CHIARA G. (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience* **89**: 637-641.
- BEINERT H., KENNEDY M.C. (1993) Aconitase, a two-faced protein: Enzyme and iron regulatory factor. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**: 1442-1449.
- BEITNER-JONSHON D., GUITART X., NESTLER E.J. (1993) Glial fibrillary acidic protein and the mesolimbic dopamine system: regulation by chronic morphine and Lewis-Fischer strain differences in the rat ventral tegmental area. *Journal of neurochemistry* **61**: 1766-1773.
- BELL R.L., KIMPEL M.W., RODD Z.A., STROTHER W.N., BAI F., PEPPER C.L., MAFYELD R.D., LUMENG L., CRABB D.W., MCBRIDE W.J., WITZMANN F.A., (2006) Protein expression changes in the nucleus accumbens and amygdala of inbred alcohol-preferring rats given either continuous or scheduled access to ethanol. *Alcohol* **40**: 3-17.
- BERANOVA-GIORGANNI S. (2003) Proteome analysis by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends in Analytical Chemistry* **22**: 1313-1327.
- BERGGREN K.N., SCHULENBERG B., LOPEZ M.F., STEINBERG T.H., BOGDANOVA A., SMEJKAL G., WANG A., PATTON W.F. (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* **2**: 486-498.
- BIERCZYNSKA-KRZYSIK A., PRADEEP JOHN J.P., SILBERRING J., KOTLINSKA J., DYLAG T., CABATIC M., LUBEC G. (2006) Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *International journal of molecular medicine* **18**: 775-784.

- BIFULCO M., LAEZZA C., STINGO S., WOLFF J. (2002) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1807-1812.
- BILLA S.K., LIU J., BJORKLUND N.L., SINHA N., FU Y., SHINNICK-GALLAGHER P., MORÓN J.A. (2010) Increased insertion of glutamate receptor 2-lacking alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors at hippocampal synapses upon repeated morphine administration. *Molecular pharmacology* **77**: 874-883.
- BISHOP AL, HALL A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. **348**: 241-255.
- BLACHLY-DYSON E., ZAMBRONICZ E.B., YU W.H., ADAMS V., MCCABE E.R., ADELMAN J., COLOMBINI M., FORTE M. (1993) Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *The Journal of biological chemistry* **268**: 1835-1841.
- BODZON-KULAKOWSKA A., SUDER P., MAK P., BIERCZYNSKA-KRZYSIK A., LUBEC G., WALCZAK B., KOTLINSKA J., SILBERRING J. (2009) Proteomic analysis of striatal neuronal cell cultures after morphine administration. *Journal of separation science* **32**: 1200-1210.
- BODZON-KUŁAKOWSKA A., KUŁAKOWSKI K., DRABIK A., MOSZCZYNSKI A., SILBERRING J., SUDER P. (2010) Morphinome--a meta-analysis applied to proteomics studies in morphine dependence. *Proteomics* **11**: 5-21.
- BOSSERT J.M., POLES G.C., WIHBEY K.A., KOYA E., SHAHAM Y. (2007) Differential effects of blockade of dopamine D1-family receptors in nucleus accumbens core or shell on reinstatement of heroin seeking induced by contextual and discrete cues. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**:12655-12663.
- BOUDREAU A.C., WOLF M.E. (2005). Behavioural sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 9144-9151.
- BRENNER-LAVIE H., KLEIN E., BEN-SHACHAR D.(2009) Mitochondrial complex I as a novel target for intraneuronal DA: modulation of respiration in intact cells. *Biochemical pharmacology* **78**: 85-95.
- BROWN J. M., YAMAMOTO B. K. (2003) Effects of amphetamines on mitochondrial function: Role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacology & therapeutics* **99**: 45-53.
- BUONO P., D'ARMIENTO F.P., TERZI G., ALFIERI A., SALVATORE F. (2001) Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system. *Journal of neurocytology* **30**: 957-965.
- BUTTERFIELD D. A., LAUDERBACK C. M. (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: Potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **32**: 1050-1060.
- CADONI C., MUTO T., DI CHIARA G. (2009) Nicotine differentially affects dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *Neuropharmacology* **57**: 496-501.
- CADONI G., DI CHIARA G. (2007) Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *Journal of neurochemistry* **103**: 487-499.
- CAILLE S., ALVAREZ-JAIMES L., POLIS I., STOUFFER D.G., PARSONS L.H. (2007) Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 3695-3702.

- CAMPBELL J.C., SZUMLINSKI K.K., KIPPIN T.E. (2009) Contribution of early environmental stress to alcoholism vulnerability. *Alcohol (Fayetteville, N. Y.)* **43**: 547-554.
- CANETE-SOLER R., REDDY K.S., TOLAN D.R., ZHAI J. (2005) Aldolases a and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 4353-4364.
- CARBALLO J.L., GARCÍA-RODRIGUEZ O., SECADES R., FERNÁNDEZ J.R., GARCÍA-CUETO E., ERRASTI J.M., AL ALABI S. (2004) Construcción y valoración de un cuestionario de factores de riesgo interpersonales para el consumo de drogas en la adolescencia. *Psicothema* **16**: 674-679.
- CARPENTER B., MCKAY M., DUNDAS S.R., LAWRIE L.C., TELFER C., MURRAY G.I. (2006) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *British journal of cancer* **95**: 921-927.
- CARR G.D., FIBIGER H.C., PHILLIPS A.G. (1989) Conditioned place preference as a measure of drug reward en *Oxford Review in Psychopharmacology. Neuropharmacological basis of reward*. Vol. 1. New York: Oxford University Press.
- CARROLL M.E., LAC S.T., NYGAARD S.T. (1989) A concurrently available nondrug reinforcer prevents the acquisition or decreases the maintenance of cocaine-reinforced behavior. *Psychopharmacology* **97**: 23-29.
- CASSADAY H.J., HORSLEY R.R., NORMAN C. (2005) Electrolytic lesions to nucleus accumbens core and shell have dissociable effects on conditioning to discrete and contextual cues in aversive and appetitive procedures respectively. *Behavioural brain research* **160**: 222-235.
- CASTRO R., RIVERA I., MARTINS C., STRUYS E.A., JANSEN E.E., CLODE N., GRAÇA L.M., BLOM H.J., JAKOBS C., DE ALMEIDA I.T. (2005) Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *Journal of molecular medicine* **83**: 831-836.
- CECCONI D., TESSARI M., WILLÉ D.R., ZOLI M., DOMENICI E., RIGHETTI P.G., CARBONI L. (2008) Serum proteomic analysis during nicotine self-administration, extinction and relapse in rats. *Electrophoresis* **29**: 1525-1533.
- CHAERKADY R., PANDEY A. (2008) Applications of proteomics to lab diagnosis. *Annual review of pathology* **3**: 485-498.
- CHAO J., NESTLER E.J. (2004). Molecular neurobiology of drug addiction. *Annual Review of Medicine* **55**: 113-132.
- CHAUDHARY J., WALIA M., MATHARU J., ESCHER E., GROVER A.K. (2001) Caloxin: a novel plasma membrane Ca²⁺ pump inhibitor. *American journal of physiology. Cell physiology* **280**: C1027-1030.
- CHEFER V.I., SHIPPENBERG T.S. (2009) Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **34**: 887-898.
- CHEN J.G., YANG C.P.H., CAMMER M., BAND HORWITZ S. (2003) Gene Expression and Mitotic Exit Induced by Microtubule-Stabilizing Drugs. *Cancer Research* **63**: 7891-7899.
- CHEN J.Q., CAMMARATA P.R., BAINES C.P., YAGER J.D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological,

- pathological and pharmacological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793: 1540-1570.
- CHEN X.L., LU G., GONG Y.X., ZHAO L.C., CHEN J., CHI Z.Q., YANG Y.M., CHEN Z., LI Q.L., LIU J.G. (2007) Expression changes of hippocampal energy metabolism enzymes contribute to behavioural abnormalities during chronic morphine treatment. *Cell research* 17: 689-700.
 - CHEVALIER F. (2010) Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome science* 8: 23.
 - CHEVALIER F., ROFIDAL V., ROSSIGOL M. (2007) Visible and fluorescent staining of two-dimensional gels. *Methods in molecular biology* 355:145-56.
 - CHEVALIER F., ROFIDAL V., VANOVA P., BERGOIN A., ROSSIGNOL M. (2004) Proteomic capacity of recent fluorescent dyes for protein staining. *Phytochemistry* 65: 1499-1506.
 - CHRISTENSEN C.J., KOHUT S.J., HANDLER S., SILBERBERG A., RILEY A.L. (2009) Demand for food and cocaine in Fischer and Lewis rats. *Behavioral neuroscience* 123: 165-171.
 - CICCOCIOPPO R., SANNA P.P., WEISS F. (2001) Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D1 antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 1976–1981.
 - COLADO M.I., ALGUACIL L.F. Drogas de abuso. Farmacología básica y clínica/Velázquez. Panamericana (2008) Madrid.
 - COLE A.R., CAUSERET F., YADIRGI G., HASTIE C.J., MCLAUCHLAN H., MCMANUS E.J., HERNÁNDEZ F., EICKHOLT B.J., NIKOLIC M., SUTHERLAND C. (2006) Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *The Journal of biological chemistry* 281: 16591–16598.
 - COMBS G.F. (2008) The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. San Diego: Elsevier
 - CONNOR M., CHRISTIE M.D. (1999) Opioid receptor signalling mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 26: 493-499.
 - CONTET C., KIEFFER B.L., BEFORT K. (2004) Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Current opinion in neurobiology* 14: 370-378.
 - COOPER G. M., R. E. HAUSMAN. (2004) *The Cell: A Molecular Approach*, 3rd ed. Washington DC: ASM Press 2004 pp: 436-440.
 - CORMIER A., MORIN C., ZINI R., TILLEMENT J.P., LAGRUE G. (2001) In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Brain research* 900: 72–79.
 - COY J.F., DRESSLER D., WILDE J., SCHUBERT P. (2005) Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clinical laboratory* 51: 257-273.
 - CRUMB W.J., CLARKSON C.W. (1990) Characterization of cocaine-induced block of cardiac sodium channels. *Biophysical journal* 57: 589-599.
 - DAS C., HOANG Q.Q., KREINBRING C.A., LUCHANSKY S.J., MERAY R.K., RAY S.S., LANSBURY P.T., RINGE D., PETSKO G.A. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4675-4680.

- DE CAMILLI P., CAMERON R., GREENGARD P. (1983) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *European journal of cell biology* **96**: 1337-1354.
- DERMARDIROSIAN C., BOKOCH G.M. (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in cell biology* **15**: 356-363.
- DI CHIARA G., BASSAREO V., FENU S., DE LUCA M.A., SPINA L., CADONI C., ACQUAS E., CARBONI E., VALENTINI V., LECCA D. (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* **47**: 227-241.
- DI CIANO P., EVERITT B.J. (2001) Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **25**: 341-360.
- DI PIETRO N.C., BLACK Y.D., KANTAK K.M. (2006) Context-dependent prefrontal cortex regulation of cocaine self-administration and reinstatement behaviors in rats. *The European journal of neuroscience* **24**: 3285–3298.
- DIETRICH J.B., MANGEOL A., REVEL M.O., BURGUN C., AUNIS D., ZWILLER J. (2005) Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology* **48**: 965–974.
- DRGON T., ZHANG P.W., JOHNSON C., WALTHER D., HESS J., NINO M., UHL G.R. (2010) Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. *PLoS one* **5**: e8832.
- ELLENBROEK B.A., VAN DER KAM E.L., VAN DER ELST M.C., COOLS A.R.. (2005) Individual differences in drug dependence in rats: the role of genetic factors and life events. *European Journal of Pharmacology* **526**: 251-258.
- ENG L.F., GHIRNIKAR R.S., LEE Y.L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years *Neurochemical research* **25**: 1439-1451.
- FAURE J.J., HATTINGH S.M., STEIN D.J., DANIELS W.M. (2009) Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in the rat frontal cortex after methamphetamine treatment. *Metabolic brain disease* **24**: 685-700.
- FEIL J., ZANGEN A. (2010) Brain stimulation in the study and treatment of addiction. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **34**: 559-574.
- FELTENSTEIN M.W., SEE R.E. (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *British journal of pharmacology* **154**: 261-274.
- FREEMAN W.M., BREBNER K., AMARA S.G., REED M.S., POHL J., PHILLIPS A.G. (2005) Distinct proteomic profiles of amphetamine self-administration transitional states. *Pharmacogenomics* **5**: 203–214.
- FREEMAN W.M., LULL M.E., PATEL K.M., BRUCKLACHER R.M., MORGAN D., ROBERTS D.C., VRANA KE. (2010) Gene expression changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following abstinence from cocaine self-administration. *BMC neuroscience* **11**:29.
- FUJII J., IKEDA Y. (2002) Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox report : communications in free radical research* **7**: 123–130.
- FUKATA Y., ITOH T. J., KIMURA T., MENAGER C., NISHIMURA T., SHIROMIZU T., WATANABE H., INAGAKI N., IWAMATSU A., HOTANI H. et al. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature cell biology* **4**: 583-591.

- GENG T., SEITZ P.K., THOMAS M.L., XU B., SOMAN K.V., KUROSKY A., LUXON B.A., CUNNINGHAM K.A. (2006) Use of surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) to study protein expression in a rat model of cocaine withdrawal. *Journal of neuroscience methods* **158**: 1–12.
- GERKE V, MOSS SE. (2002) Annexins: From Structure to Function. *Physiological reviews* **82**: 331-371.
- GIGY S.P., RIST B., GERBER S.A., TURECEK F., GELB M.H., AEBERSOLD R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**: 994-999.
- GIL C. (2003) La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de de función. *Actualidad SEM* **35**: 12-20.
- GONCALVES S., PAUPE V., DASSA E.P., BRIÈRE J.J., FAVIER J., GIMENEZ-ROQUEPLO A.P., BÉNIT P., RUSTIN P. (2010) Rapid determination of tricarboxylic acid cycle enzyme activities in biological samples. *BMC biochemistry* **11**: 5.
- GRANT S.G., BLACKSTOCK W.P. (2001) Proteomics in neuroscience: from protein to network. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 8315-8318.
- GRUHLER S, KRATCHMAROVA I. (2008) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Methods in molecular biology* **424**: 101-111.
- GUINDALINI C., O'GARA C., LARANJEIRA R., COLLIER D., CASTELO A., VALLADA H., BREEN G.A. (2005) GSTP1 functional variant associated with cocaine dependence in a Brazilian population. *Pharmacogenetics and genomics* **15**: 891–893.
- GUITART X., BEITNER-JOHNSON D., MARBY D.W., KOSTEN T.A., NESTLER E.J. (1992) Fischer and Lewis rat strains differ in basal levels of neurofilament proteins and their regulation by chronic morphine in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* **12**: 242-253.
- HAILE C.N., HIROI N., NESTLER E.J., KOSTEN T.A. (2001) Differential behavioral responses to cocaine are associated with dynamics of mesolimbic dopamine proteins in Lewis and Fischer 344 rats. *Synapse (New York, N.Y.)* **41**: 179-190.
- HAILE C.N., KOSTEN T.A. (2001) Differential effects of D1- and D2-like compounds on cocaine self-administration in Lewis and Fischer 344 inbred rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **299**: 509-518.
- HAKAK Y., WALKER J.R., LI C., WONG W.H., DAVIS K.L., BUXBAUM J.D., HAROUTUNIAN V., FIENBERG A.A. (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination- related genes in chronic schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4746-4751.
- HALL D.A., PTACEK J., SNYDER M. (2007) Protein microarray technology. *Mechanisms of ageing and development* **128**:161-167.
- HAMAMURA M., OZAWA H., KIMURO Y., OKOUCHI J., HIGASA K., IWAKI A., FUKUMAKI Y. (1999) Differential decreases in c-fos and aldolase C mRNA expression in the rat cerebellum after repeated administration of methamphetamine. *Brain research. Molecular brain research* **64**: 119-131.
- HAMON M. (2002) Neurobiological mechanisms of dependence: implication of serotonin. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine* **186**: 307-315; discussion 315-317.
- HARGREAVES G.A., QUINN H., KASHEM M.A., MATSUMOTO I., MCGREGOR I.S. (2009) Proteomic analysis demonstrates adolescent vulnerability to lasting hippocampal changes

- following chronic alcohol consumption. *Alcoholism, clinical and experimental research* **33**: 86-94.
- HASTINGS T.G., LEWIS D.A., ZIGMOND M.J. (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 1956-1961.
 - HASTINGS T.G., ZIGMOND M.J. (1994) Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slices incubated with [3H]dopamine: impact of ascorbic acid and glutathione. *Journal of neurochemistry* **63**: 1126-1132.
 - HAZELL A.S., SHEEDY D., OANEA R., AGHOURIAN M., SUN S., JUNG J.Y., WANG D., WANG C. (2010) Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy. *Glia* **58**: 148-156.
 - HEIMER L., ZAHM D.S., CHURCHILL L., KALAIVAS P.W., WOHLTMANN C. (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* **41**: 89-125.
 - HERRADON G., EZQUERRA L., NGUYEN T., HUANG C., SISO A., FRANKLIN B., DILORENZO L., ROSSENFELD J., SILOS-SANTIAGO I., ALGUACIL L.F. (2008) Noradrenergic and opioidergic alterations in neuropathy in different rat strains. *Neuroscience letters* **438**: 186-189.
 - HERRADON G., MORALES L., ALGUACIL L.F. (2003a) Differences of mu-opioid receptors between Lewis and F344 rats. *Life sciences* **73**: 1537-1542.
 - HERRADON G., MORALES L., PÉREZ-GARCÍA C., ALGUACIL L.F. (2003b). The contribution of alpha2-adrenoceptor and opioid receptor mechanisms to antinociception differs in Lewis and Fischer 344 rats. *European journal of pharmacology* **465**: 251-256.
 - HØJSTED J., SJØGREN P. (2008) Addiction to opioids in chronic pain patients: a literature review. *European journal of pain* **11**: 490-518.
 - HORECKER B.L. (2002) The pentose phosphate pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**: 47965–47971.
 - HOTTA A., INATOME R., YUASA-KAWADA J., QIN Q., YAMAMURA H. AND YANAGI S. (2005) Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons. *Molecular biology of the cell* **16**: 32-39.
 - HWANG Y.Y., LI M.D. (2006) Proteins differentially expressed in response to nicotine in five rat brain regions: Identification using a 2-DE/MS-based proteomics approach. *Proteomics* **6**: 3138–3153.
 - IKEMOTO A., BOLE D.G., UEDA T. (2003) Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *The Journal of biological chemistry* **278**: 5929–5940.
 - INAGAKI N., CHIHARA K., ARIMURA N., MENAGER C., KAWANO Y., MATSUO N., NISHIMURA T., AMANO M., KAIBUCHI K. (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature neuroscience* **4**: 781-782.
 - ISHIKAWA N., SHIMADA N., MUNAKATA Y., WATANABE K., KIMURA N. (1992) Isolation and characterization of a gene encoding rat nucleoside diphosphate kinase. *The Journal of biological chemistry* **267**: 14366-14372.
 - ITZHAK Y., MARTIN J.L. (2002) Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* **26**: 130-134.

-
- IWATA S., LEE J.W., OKADA K., LEE J.K., IWATA M., RASMUSSEN B., LINK T.A., RAMASWAMY S., JAP B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* **281**: 64-71.
 - IWAZAKI T., MCGREGOR I.S., MATSUMOTO I. (2006) Protein expression profile in the striatum of acute methamphetamine-treated rats. *Brain research* **1097**: 19-25.
 - IWAZAKI T., MCGREGOR I.S., MATSUMOTO I. (2007) Protein expression profile in the striatum of rats with methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Proteomics* **7**: 1131-1139.
 - JENKINS N. (2007) Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. *Cytotechnology* **53**: 121-125.
 - JIMÉNEZ-MURO FRANCO A., BEAMONTE SAN AGUSTÍN A., MARQUETA A., GARGALLO VALERO P., NERÍN DE LA PUERTA I. (2009) Addictive substance use among first-year university students. *Adicciones* **21**: 21-28.
 - JIN L.T., LI X.K., CONG W.T., HWANG S.Y., CHOI J.K. (2008) Previsible silver staining of protein in electrophoresis gels with mass spectrometry compatibility. *Analytical Biochemistry* **383**: 137-143.
 - JONGEN-RÊLO A.L., KAUFMANN S., FELDON J. (2003) A differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens of rats in memory processes. *Behavioral neuroscience* **117**: 150-168.
 - JOSEPHSON I., SPERELAKIS N. (1976) Local anesthetic blockade of Ca²⁺ -mediated action potentials in cardiac muscle. *European journal of pharmacology* **40**: 201-208.
 - KAJI H., TSUJI T., MAWUENYEGA K.G., WAKAMIYA A., TAOKA M., ISOBE T. (2000) Profiling of *Caenorhabditis elegans* proteins using two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 1755-1765.
 - KALIVAS P.W., STEWARD J. (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain research reviews* **16**: 223-244.
 - KALIVAS P.W., VOLKOW N., SEAMANS J. (2005) Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* **45**: 647-650.
 - KALIVAS P.W., VOLKOW N.D. (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry* **162**: 1403-1413.
 - KANG U.B., AHN Y., LEE J.W., KIM Y.H., KIM J., YU M.H., NOH D.Y., LEE C. (2010) Differential profiling of breast cancer plasma proteome by isotope-coded affinity tagging method reveals biotinidase as a breast cancer biomarker. *BMC cancer* **10**:114.
 - KASHEM M.A., HARPER C., MATSUMOTO I. (2008) Differential protein expression in the corpus callosum (genu) of human alcoholics. *Neurochemistry international* **53**: 1-11.
 - KELLEY A.E., BERRIDGE K.C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 3306-3311.
 - KELZ M.B., CHEN J., CARLEZON W.A. JR, WHISLER K., GILDEN L., BECKMANN A.M., STEFFEN C., ZHANG Y.J., MAROTTI L., SELF D.W., TKATCH T., BARANAUSKAS G., SURMEIER D.J., NEVE R.L., DUMAN R.S., PICCIOTTO M.R., NESTLER E.J. (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**: 272-276.

- KENYON G.L., DEMARINI D.M., FUCHS E., GALAS D.J., KIRSCH J.F., LEYH T.S., MOOS W.H., PETSKO G.A., RINGE D., RUBIN G.M., SHEAHAN L.C. NATIONAL RESEARCH COUNCIL STEERING COMMITTEE. (2002) Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **1**: 763-780.
- KILE B.M., GUILLOT T.S., VENTON B.J., WETSEL W.C., AUGUSTINE G.J., WIGHTMAN R.M. (2010) Synapsins differentially control dopamine and serotonin release. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 9762-9770.
- KILPATRICK G.J., HAGAN R.M., GALE J.D. (1996) 5-HT3 and 5-HT4 receptors in terminal regions of the mesolimbic system. *Behavioural brain research* **73**: 11-13.
- KIM H., LEE T.H., PARK E.S., SUH J.M., PARK S.J., CHUNG H.K., KWON O.Y., KIM Y.K., RO H.K., SHONG M. (2000) Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 18266-18270.
- KIM S., VOSHOL H., VAN OOSTRUM J., HASTINGS T.G., CASCIO M, GLUCKSMAN M.J. (2004) Neuroproteomics: Expression profiling of the brain's proteomes in health and diseases. *Neurochemical research* **29**: 1317-1331.
- KIM S.Y., CHUDAPONGSE N., LEE S.M., LEVIN M.C., OH J.T., PARK H.J., HO I.K. (2005) Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in morphine- dependent rat brains. *Brain research. Molecular brain research* **133**: 58-70.
- KIRALY D.D., MA X.M., MAZZONE C.M., XIN X., MAINS R.E., EIPPER B.A. (2010) Behavioral and morphological responses to cocaine require kalirin7. *Biological psychiatry* **68**: 249-255.
- KLOSE J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**: 231-243.
- KLOSS M.W., ROSEN G.M., RAUCKMAN E.J. (1984) Biotransformation of norcocaine to norcocaine nitroxide by rat brain microsomes. *Psychopharmacology (Berl)* **84**: 221-224.
- KOBEISSY F.H., ZHANG Z., SADASIVAN S., GOLD M.S., WANG K.K. (2009) Methods in drug abuse neuroproteomics: methamphetamine psychoproteome. *Methods in molecular biology* **566**: 217-228.
- KOOB G.F., AHMED S.H., BOUTREL B., CHEN S.A., KENNY P.J., MARKOU A., O'DELL L.E., PARSONS L.H., SANNA P.P. (2004) Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **27**: 739-749.
- KOOB G.F., LE MOAL M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**: 97-129.
- KOOB G.F., LE MOAL M. (2008). Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**: 3113-3123.
- KORNETSKY C., PORRINO L.J. (1992) Brain mechanisms of drug-induced reinforcement. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* **70**: 59-77.
- KOSTEN T.A., AMBROSIO E. (2002) HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology* **27**: 35-69.
- KOSTEN T.A., MISERENDINO M.J., HAILE C.N., DECAPRIO J.L., JATLOW P.I., NESTLER E.J. (1997) Acquisition and maintenance of intravenous cocaine self-administration in Lewis and Fischer inbred rat strains. *Brain research* **778**: 418-429.

-
- KOSTEN T.A., ZHANG X.Y., HAILE C.N. (2007) Strain differences in maintenance of cocaine self-administration and their relationship to novelty activity responses. *Behavioral neuroscience* **121**: 380-388.
 - KOYA E., SPIJKER S., VOORN P., BINNEKADE R., SCHMIDT E.D., SCHOFFELMEER A.N., DE VRIES T.J., SMIT A.B. (2006) Neurochem. 2006 Aug; Epub 2006 Jun 19. Enhanced cortical and accumbal molecular reactivity associated with conditioned heroin, but not sucrose-seeking behaviour. *Journal of neurochemistry* **98**: 905-915.
 - KRASNOVA I.N., JUSTINOVA Z., LADENHEIM B., JAYANTHI S., MCCOY M.T., BARNES C., WARNER J.E., GOLDBERG S.R., CADET J.L. (2010) Methamphetamine self-administration is associated with persistent biochemical alterations in striatal and cortical dopaminergic terminals in the rat. *PLoS One* **5**: e8790.
 - KREEK M.J., BART G., LILLY C., LAFORGE K.S., NIELSEN D.A. (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacological reviews* **57**: 1-26.
 - LAAKSO A., MOHN A.R., GAINETDINOV R.R., CARON M.G. (2002). Experimental genetic approaches to addiction. *Neuron* **36**: 213-228.
 - LAMANDA A., ZAHN A., RODER D., LANGEN H. (2004) Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* **4**: 599-608.
 - LANNE B., PANFILOV O (2005) Protein staining influences the quality of mass spectra obtained by peptide mass fingerprinting after separation on 2-D gels. A comparison of staining with coomassie brilliant blue and SYPRO Ruby. *Journal of Proteome Research* **4**: 175-179.
 - LAPORTE D.C. (1993) The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: Regulation and enzymology. *Journal of cellular biochemistry* **51**: 14–18.
 - LARIVIERE R. JULIEN J.P. (2004) Functions of Intermediate Filaments in Neuronal Development and Disease. *Journal of Neurobiology* **58**: 131-48.
 - LATCHMAN D.S. (2004) Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. *Current neurovascular research* **1**: 21–27.
 - LAVOIE J., BUTTERWORTH R.F. (1995) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in brains of alcoholics in the absence of Wernicke's encephalopathy. *Alcoholism, clinical and experimental research* **19**: 1073–1077.
 - LEDIG M., THOLEY G., KOPP P., MANDEL P. (1989) An experimental study of fetal alcohol syndrome in the rat: biochemical modifications in brain and liver. *Alcohol and alcoholism* **24**: 231-240.
 - LEE A., MESSING R.O. (2008) Protein Kinases and addiction *Annals of the New York Academy of Sciences* **1141**: 22–57.
 - LEE C.T., LEHRMANN E., HAYASHI T., AMABLE R., TSAI S.Y., CHEN J., SANCHEZ J.F., SHEN J., BECKER K.G., FREED W.J. (2009) Gene Expression Profiling Reveals Distinct Cocaine-Responsive Genes in Human Fetal CNS Cell Types. *Journal of addiction medicine* **3**: 218-226.
 - LEE E., DE CAMILLI P. (2002) Dynamin at actin tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 161-166.
 - LEE J.H., GARBOCZI D.N., THOMAS P.J., PEDERSEN P.L. (1990) Mitochondrial ATP synthase. cDNA cloning, amino acid sequence, overexpression, and properties of the rat liver alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* **265**: 4664–4669.

- LEVAVASSEUR F., ZHU Q., JULIEN J.P. (1999) No requirement of alpha-internexin for nervous system development and for radial growth of axons. *Brain research. Molecular brain research* **69**: 104-112.
- LEWOHL J.M., VAN DYK D.D., CRAFT G.E., INNES D.J., MAYFIELD R.D., COBON G., HARRIS R.A., DODD P.R. (2004) The application of proteomics to the human alcoholic brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1025**: 14-26.
- LI C.Y., MAO X., WEI L. (2008) Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS computational biology* **4**: e2.
- LI K.W., JIMENEZ C.R., VAN DER SCHORS R.C., HORNSHAW M.P., SCHOFFELMEER A.N., SMIT A.B. (2006) Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. *Proteomics* **6**: 2003-2008.
- LI M.D., WANG J. (2007) Neuroproteomics and its applications in research on nicotine and other drugs of abuse. *Proteomics. Clinical applications* **1**: 1406–1427.
- LI Q., ZHAO X., ZHONG L.J., YANG H.Y., WANG Q., PU X.P. (2009) Effects of chronic morphine treatment on protein expression in rat dorsal root ganglia. *European journal of pharmacology* **612**: 21-28.
- LI K. W., JIMENEZ C. R., VAN DER SCHORS R. C., HORNSHAW M. P. SCHOFFELMEER A.N., SMIT A.B. (2006) Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. *Proteomics* **6**: 2003–2008.
- LIZASOAIN I., MORO M.A. "Cocaína (I): Farmacología". En "Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación." LORENZO P, LADERO J.M., LEZA J.C. LIZASOAIN I., Pamericana (2003) Madrid.
- LORENTZEN E., SIEBERS B., HENSEL R., POHL E. (2005) Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* **44**: 4222–4229.
- LU L., DEMPSEY J., LIU S.Y., BOSSERT J.M., SHAHAM Y. (2004) A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 1604-1611.
- LUBEC G., KRAPPENBAUER K., FOUNTOULAKIS M. (2003) Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in neurobiology* **69**: 193-211.
- LULL M.E., ERWIN M.S., MORGAN D., ROBERTS D.C., VRANA K.E., FREEMAN W.M. (2009) Persistent proteomic alterations in the medial prefrontal cortex with abstinence from cocaine self-administration. *Proteomics. Clinical applications* **3**: 462-472.
- MACEDO D.S., DE VASCONCELOS S.M., DOS SANTOS R.S., AGUIAR L.M., LIMA V.T., VIANA G.S., DE SOUSA F.C. (2005) Cocaine alters cabalase activity in prefrontal cortex and striatum of mice. *Neuroscience letters* **387**: 53–56.
- MARIE-CLAIRE C., COURTIN C., ROQUES B.P., NOBLE F. (2004) Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum' *Neuropsychopharmacology* **29**: 2208–2215.
- MARTIN B., BRENNEMAN R., BECKER K.G., GUCEK M., COLE R.N., MAUDSLEY S. (2008) iTRAQ analysis of complex proteome alterations in 3xTgAD Alzheimer's mice: understanding the interface between physiology and disease. *PloS one* **3**: e2750.
- MARTIN M., LORENZO P. "Conceptos fundamentales en drogodependencias" en "Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación." LORENZO P, LADERO J.M., LEZA J.C. LIZASOAIN I., Pamericana (2003) Madrid.

-
- MARTIN M.I., GOICOECHEA C. (2004) "Fármacos analgésicos opiodes" en "Velázquez. Farmacología básica y clínica". LORENZO P., MORENOA., LEZA J.C., LIZASOAIN I. MORO M.A. Panamericana (2004) Madrid.
 - MASH D.C., ADI N., DUQUE L., PABLO J., KUMAR M., ERVIN F.R. (2008) Alpha synuclein protein levels are increased in serum from recently abstinent cocaine abusers. *Drug and alcohol dependence* **94**: 246–250.
 - MAURER M.H. (2006) Software analysis of two-dimensional electrophoretic gels in proteomic experiments. *Current Bioinformatics* **1**: 255-262.
 - MAURICE T., MARTIN-FANDON R., ROMIEU P., MASUMOTO R.R. (2002) Sigma(1) (sigma(1)) receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **26**: 499-527.
 - MCCORMICK D.B., GREGORY M.E., SNELL E.E. (1961) Pyridoxal phosphokinases. I. Assay, distribution, purification, and properties. *The Journal of biological chemistry* **236**: 2076–2084.
 - MCGRATH J.A. (2003) Biologic lessons from mutations in the Kreb's cycle enzyme, fumarate hydratase. *The Journal of investigative dermatology* **121** (vii).
 - MCLAUGHLIN J., SEE R.E. (2003) Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdale attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* **168**: 57–65.
 - MEIL W.M., ROLL J.M., GRIMM J.W., LYNCH A.M., SEE R.E. (1995) Tolerance-like attenuation to contingent and noncontingent cocaine-induced elevation of extracellular dopamine in the ventral striatum following 7 days of withdrawal from chronic treatment. *Psychopharmacology* **118**: 338-346.
 - MEREDITH G.E. (1999) The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Annals of the New York Academy of Sciences* **877**: 140-156.
 - METZ C.N., BUCALA R. (1997) Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Advances in immunology* **66**: 197–223.
 - MIAO L., ST CLAIR D.K. (2009) Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine* **47**: 344-356.
 - MILLER J.A., OLDHAM M.C., GESCHWIND D.H. (2008) A systems level analysis of transcriptional changes in Alzheimer's disease and normal aging. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 1410-1420.
 - MOHN A.R., YAO W., CARON M.G. (2004). Genetic and genomic approaches to reward and addiction. *Neuropharmacology* **47**: 101-110.
 - MOR F., IZAK M., COHEN I.R. (2005) Identification of aldolase as a target antigen in Alzheimer's disease. *Journal of immunology* **175**: 3439–3445.
 - MORALES L., PEREZ-GARCÍA C., HERRADÓN G., ALGUACIL L.F (2007) Place conditioning in two- or three-conditioning compartment apparatus: a comparative study with morphine and U-50,488. *Addiction Biology* **12**: 482-484.
 - MORON J.A., ABUL-HUSN N.S., ROZENFELD R., DOLIOS G., WANG R., DEVI L.A. (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**: 29–42.

- MORRISON R.S., KINOSHITA Y., JOHSON M.D., UO T., HO J.T., MCBEE J.K., CONRADS T.P., VEENSTRA T.D. (2002) Proteomic analysis in the neuroscience. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1** : 553-560.
- MORTZ E., KROGH T.N., VORUM H., GORG A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**: 1359-1363.
- MUELLER D., STEWART J. (2000) Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural brain research*: **115** (1): 39-47.
- MÜLLER C.P., CAREY R.J., HUSTON J.P., DE SOUZA SILVA M.A. (2007) Serotonin and psychostimulant addiction: focus on 5-HT1A-receptors. *Progress in neurobiology* **81**: 133-178.
- MURPHEY, R. K., GODENSCHWEGE, T. A. (2002) New roles for ubiquitin in the assembly and function of neuronal circuits. *Neuron* **36**: 5–8.
- NADER M.A., CZOTY P.W. (2005) PET imaging of dopamine D2 receptors in monkey models of cocaine abuse: genetic predisposition versus environmental modulation. *The American journal of psychiatry* **162**: 1473-1482.
- NADER M.A., HEDEKER D., WOOLVERTON W.L. (1993) Behavioral economics and drug choice: effects of unit price on cocaine self-administration by monkeys. *Drug and alcohol dependence* **33**: 193-199.
- NAKAMURA K., CHEN C.K., SEKINE Y., IWATA Y., ANITHA A., LOH EL-W., TAKEI N., SUZUKI A., KAWAI M., TAKEBAYASHI K., SUZUKI K., MINABE Y., TSUCHIYA K., YAMADA K., IYO M., OZAKI N., INADA T., IWATA N., HARANO M., KOMIYAMA T., YAMADA M., SORA I., UJIKE H., BALL D.M., YOSHIKAWA T., LIN S.K., MORI N. (2006) Association analysis of SOD2 variants with methamphetamine psychosis in Japanese and Taiwanese populations. *Human genetics* **120**: 243-252.
- NCBI en: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermTSearch=5604. Acceso: Noviembre de 2010.
- NEBRICH G., LIEGMANN H., WACKER M., HERRMANN M., SAGI D., LANDOWSKY A., KLOSE J. (2005) Proteomer, a novel software application for management of proteomic 2DE-gel data-II application. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**: S296-S296.
- NESTLER E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews. Neuroscience* **2**: 119–128.
- NESTLER E.J. (2001a) Molecular neurobiology of addiction. *The American journal on addictions* **10**: 201-217.
- NESTLER E.J. (2001b) Psychogenomics: opportunities for understanding addiction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 8324-8327.
- NESTLER E.J. (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* **47**: 24-32.
- NESTLER E.J., TERWILLIGER R.Z., WALKER J.R., SEVARINO K.A., DUMAN R.S. (1990) Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. *Journal of neurochemistry* **55**: 1079-1082.
- NEUHOFF V., STAMM R., PARDOWITZ I., AROLD N., EHRHARDT W., TAUBE D. (1990) Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* **11**: 101-117.

-
- NICHOLLS D.G. (2003) Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochemical research* **28**: 1433-1441.
 - O'FARRELL P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry* **250**: 4007-4021.
 - OLAUSSON P., JENTSCH J.D., KRUEGER D.D., TRONSON N.C., NAIRN A.C., TAYLOR J.R. (2007) Orbitofrontal cortex and cognitive-motivational impairments in psychostimulant addiction: evidence from experiments in the non-human primate. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1121**: 610-638.
 - ORTIZ J., DECAPRIO J.L., KOSTEN T.A., NESTLER E.J. (1995) Strain-selective effects of corticosterone on locomotor sensitization to cocaine and on levels of tyrosine hydroxylase and glucocorticoid receptor in the ventral tegmental area. *Neuroscience* **67**: 383-397.
 - OZMEN I., NAZIROGLU M., ALICI H. A., SAHIN F. CENGIZ M, EREN I. (2007) Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochemical research* **32**: 19-25.
 - PAN S., AEBERSOLD R. (2007) Quantitative proteomics by stable isotope labeling and mass spectrometry. *Methods in molecular biology* **367**: 209-218.
 - PANCHOLI V. (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **58**: 902-920.
 - PANDEY A., MANN N. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**: 837-846.
 - PARRAGA A., GARCIA-SAEZ I., WALSH S.B., MANTLE T.J., COLL M. (1998) The threedimensional structure of a class-Pi glutathione S-transferase complexed with glutathione: the active-site hydration provides insights into the reaction mechanism. *The biochemical Journal* **333**: 811-816.
 - PATTON W.F. (2002) Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **771**: 3-31.
 - PETERS J., KALIVAS P.W., QUIRK G.J. (2009) Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & memory* **16**: 279-288.
 - PETERSON E.A., PETTY E.M. (2010) Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clinical genetics* **77**: 511-524.
 - PETYUK V.A., QIAN W.J., HINAULT C., GRITSENKO M.A., SINGHAL M., MONROE M.E., CAMP D.G. 2nd, KULKARNI R.N., SMITH R.D. (2008) Characterization of the mouse pancreatic islet proteome and comparative analysis with other mouse tissues. *Journal of proteome research* **7**: 3114-3126.
 - POON H. F., ABDULLAH L., MULLAN M.A., MULLAN M.J., CRAWFORD F.C. (2007) Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochemistry internacional* **50**: 69-73.
 - PRAKASH S., AMBROSIO E., ALGUACIL L.F., DEL OLMO N. (2009) Genetic differences in hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* **161**: 342-346.
 - PRINZLEVE M., HAASEN C., ZURHOLD H., MATALI J.L., BRUGUERA E., GEREVICH J., BÁCASKAI E., RYDER N., BUTLER S., MANNING V., GOSSOP M., PEZOUS A.M., VERSTER A., CAMPOSERAGNA A., ANDERSSON P., OLSSON B., PRIMORAC A., FISCHER G., GÜTTINGER F., REHM J., KRAUSZ M. (2004) Cocaine use in Europe - a multi-centre study: patterns of use in different groups. *European addiction research* **10**:147-155.
 - PROKAI L., ZHARIKOVA A. D., STEVENS S. M. JR. (2005) Effect of chronic morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: A quantitative protein

- profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* **40**: 169–175.
- PRZEWLOCKI R. (2004) Opioid abuse and brain gene expression. *European journal of pharmacology* **150**: 331-349.
 - RABILLOUD T. (1992) A comparison between low background silver diammine and silver-nitrate protein stains. *Electrophoresis* **13**: 429-439.
 - RABINOVIC A.D., LEWIS D.A., HASTINGS T.G. (2000) Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine. *Neuroscience* **101**: 67-76.
 - RAZ S., BERGER B.D. (2010) Social isolation increases morphine intake: behavioral and psychopharmacological aspects. *Behavioural pharmacology* **21**: 39-46.
 - RETTIG J., NEHER E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Cαpp-triggered exocytosis. *Science* **298**: 781–785.
 - REYES TURCU F.E., VENTII K.H., WILKINSON K.D. (2009). Activity and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **78**: 363–397.
 - REYNOLDS J.L., MAHAJAN S.D., BINDUKUMAR B., SYKES D., SCHWARTZ S.A., NAIR M.P. (2006) Proteomic analysis of the effects of cocaine on the enhancement of HIV-1 replication in normal human astrocytes (NHA). *Brain research* **1123**: 226–236.
 - RHEE S.G., CHAE H.Z., KIM K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free radical biology & medicine* **38**: 1543–1552.
 - RICHARDS J.R., JOHNSON E.B., STARK R.W., DERLET R.W. (1999) Methamphetamine abuse and rhabdomyolysis in the ED: a 5-year study. *The American journal of emergency medicine* **17**: 681-685.
 - RICHARDSON N.R., SMITH A.M., ROBERTS D.C. (1994) A single injection of either flupenthixol decanoate or haloperidol decanoate produces long-term changes in cocaine self-administration in rats. *Drug and alcohol dependence* **36**: 23-25.
 - RIGDEN D.J. (2008) The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *The Biochemical journal* **409**: 333-348.
 - ROBERTS D.C., KOOB G.F. (1982) Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **17**: 901-904.
 - ROBERTS D.C., KOOB G.F., KLONOFF P., FIBIGER H.C. (1980) Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **12**: 781-787.
 - ROBINSON T.E., BERRIDGE K.C. (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* **363**: 3137-3146.
 - RODRÍGUEZ DE FONSECA F. (2005) “Neuroanatomía funcional” en “Tratados SET de transtornos adictivos”. PÉREZ J.C., VALDERRAMA J.C., CERVERA G., RUBIO G. Panamericana (2005) Madrid.
 - ROESLER S., SANDROCK K., BARTSCH I., ZIEGER B. (2009) Septins, a novel group of GTP-binding proteins: relevance in hemostasis, neuropathology and oncogenesis. *Klinische Pädiatri* **221**:150-155.

-
- ROGERS J.L., GHEE S., SEE R.E. (2008) The neural circuitry underlying reinstatement of heroin-seeking behavior in an animal model of relapse. *Neuroscience* **151**: 579–588.
 - SÁNCHEZ-CARDOSO P., HIGUERAS-MATAS A., MARTÍN S., MIGUÉNS M., DEL OLMO N., GRACÍA-LECUMBERRI C., AMBROSIO E. (2009) Strain differences between Lewis and Fischer F344 rats in the modulation of dopaminergic receptors alter morphine self-administration. *Neuropharmacology* **57**: 8-17.
 - SARI Y, ZHANG M, MECHREF Y. (2010) Differential expression of proteins in fetal brains of alcohol-treated prenatally C57BL/6 mice: a proteomic investigation. *Electrophoresis* **31**: 483-496.
 - SCHERP P., KU G., COLEMAN L., KHETERPAL I. (2010) Gel-Based and Gel-Free Proteomic Technologies. *Methods in molecular biology* **702**: 163-190.
 - SCHMIDT E. F., STRITTMATTER S. M. (2007) The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Advances in experimental medicine and biology*. **600**: 1-11.
 - SCHOERDER J.A., NICULESCU M., UNTERWALD E.M. (2003) Cocaine alters mu but not delta or kappa opioid receptor-stimulated in situ [35S]GTPgammaS binding in rat brain. *Synapse* **47**: 26-32.
 - SCHROEDER J.A., MCCAFFERTY M.R., UNTERWALD E.M. (2009) Regulation of dynamin 2 and G protein-coupled receptor kinase 2 in rat nucleus accumbens during acute and repeated cocaine administration. *Synapse* **63**: 863-870.
 - SCHWIKOWSKI B., UETZ P., FIELDS S. (2000) A network of protein-protein interactions in yeast. *Nature biotechnology* **18**: 1257–1261.
 - SHARKEY J., GLEN K.A., WOLFE S., KUCHAR M.J. (1988b) Cocaine binding at sigma receptors. *European journal of pharmacology* **49**: 171-174.
 - SHARKEY J., RITZ M.C., SECHENDEN J.A., HANSON R.C., KUCHAR M.J. (1988a) Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **246**: 1048-1052.
 - SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**: 850-858.
 - SHI M., BRADNER J., BAMMLER T.K., EATON D.L., ZHANG J., YE Z., WILSON A.M., MONTINE T.J., PAN C., ZHANG J. (2009) Identification of glutathione S-transferase pi as a protein involved in Parkinson disease progression. *The American journal of pathology* **175**: 54-65.
 - SIDAHMED-MEZI M., PUMAIN R., LOUVEL J., SOKOLOFF P., LASCHET J. (2010) New therapeutic targets to develop molecules active in drug-resistant epilepsies. *Epilepsia* **51**: 43-47.
 - SINCHAIKUL S., HONGSACHART P., SRIYAM S., TANTIPAIBOONWONG P., PHUTRAKUL S., CHEN S.T. (2008) Current proteomic analysis and post-translational modifications of biomarkers in human lung cancer materials. *Chang Gung medical journal* **31**: 417-430.
 - SINHA P., POLAND J., SCHNOLZER M., RABILLOUD T. (2001) A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **1**: 835-840.
 - SINHA R. (2009) Modeling stress and drug craving in the laboratory: implications for addiction treatment development. *Addiction biology* **14**: 84-98.
 - SMEJKAL G.B. (2004) The Coomassie chronicles: past, present and future perspectives in polyacrylamide gel staining. *Expert Review of Proteomics* **1**: 381-387.

- SMILLIE K.J., COUSIN M.A. (2005) Dynamin I phosphorylation and the control of synaptic vesicle endocytosis. *Biochemical Society symposium* **72**: 87-97.
- SOKOLOWSKI J.D., CONLAN A.N., SALAMONE J.D. (1998) A microdialysis study of nucleus accumbens core and shell dopamine during operant responding in the rat. *Neuroscience* **86**: 1001-1009.
- SOMOGYI A.A., BARRATT D.T, COLLER J.K. (2007) Pharmacogenetics of opioids. *Clinical pharmacology and therapeutics* **81**: 429-444.
- SRIVASTAVA V., BUZAS B., MOMENAN R., OROSZI G., PULAY A.J., ENOCH M.A., HOMMER D.W., GOLDMAN D. (2010) Association of SOD2, a mitochondrial antioxidant enzyme, with gray matter volume shrinkage in alcoholics. *Neuropsychopharmacology* **35**: 1120-1128.
- STEKETEE J.D. (2005) Cortical mechanisms of cocaine sensitization. *Critical reviews in neurobiology* **17**: 69-86.
- STEPHENS M.K., RILEY A.L. (2009) Naloxone-precipitated conditioned taste aversions in morphine-dependent Fischer (F344) and Lewis rat strains. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **92**: 60-67.
- SUN A.Y., SUN G.Y. (2001) Ethanol and oxidativemechanisms in the brain. *Journal of biomedical science* **8**: 37–43.
- SUTTON M.A., SCHMIDT E.F., CHOI K.H., SCHAD C.A., WHISLER K., SIMMONS D., KARANIAN D.A., MONTEGGIA L.M., NEVE R.L., SELF D.W. (2003) Extinction-induced upregulation in AMPA receptors reduces cocaine-seeking behaviour. *Nature* **421**: 70-75.
- SWERDLOW N.R., GILBERT D., KOOD G.F. (1989) Conditioned drug effects on spatial preference en *Neuromethods. Psychopharmacology*. Vol **13**. Clifton, New Jersey: Human Press.
- TALPADE D.J., GREENE J.G., HIGGINS JR. D.S., GREENAMYRE J.T. (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *Journal of neurochemistry* **75**: 2611–2621.
- TANDA G., EBBS A.L., KOPAJTIC T.A., ELIAS L.M., CAMPBELL B.L., NEWMAN A.H., KATZ J.L. (2007) Effects of muscarinic M1 receptor blockade on cocaine-induced elevations of brain dopamine levels and locomotor behavior in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **321**: 334-344.
- TANNU N., MASH D.C., HEMBY S.E. (2007) Cytosolic proteomic alterations in the nucleus accumbens of cocaine overdose victims. *Molecular psychiatry* **12**: 55–73.
- TANNU N.S., HOWELL L.L., HEMBY S.E. (2010). Integrative proteomic analysis of the nucleus accumbens in rhesus monkeys following cocaine self-administration. *Molecular psychiatry* **15**: 185-203.
- TAYLOR J.R., LYNCH W.J., SANCHEZ H., OLAUSSON P., NESTLER E.J., BIBB J.A. (2007) Inhibition of Cdk5 in the nucleus accumbens enhances the locomotor-activating and incentive-motivational effects of cocaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4147–4152.
- TILLEMANN K., STEVENS I., SPITTAELS K., HAUTE C.V., CLERENS S., VAN DEN BERGH G., GEERTS H., VAN LEUVEN F., VANDESANDE F., MOENS L. (2002) Differential expression of brain proteins in glycogen synthase kinase-3 transgenic mice: a proteomics point of view. *Proteomics* **2**: 94-104.

- TODA S., SHEN H.W., PETERS J., CAGLE S., KALIVAS P.W. (2006) Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 1579-1587.
- TONGE R., SHAW J., MIDDLETON B., ROWLINSON R., RAYNER S., YOUNG J., POGNAN F., HAWKINS E., CURRIE I., DAVISON M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **3**: 377-396.
- TÓTH A.R., VARGA T. (2009) Myocardium and striated muscle damage caused by licit or illicit drugs. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* **11** Suppl 1: S484-487.
- TSANKOVA N., RENTHAL W., KUMAR A., NESTLER E.J. (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience* **8**: 355-67.
- TZSCHENTKE T.M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in neurobiology* **56** (6): 613-672.
- TZSCHENTKE T.M. (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction biology* **12**: 227-462.
- TZSCHENTKE T.M., SCHMIDT W.J. (2003) Glutamatergic mechanisms in addiction. *Molecular psychiatry* **8**: 373-382.
- UHART M., WAND G.S. (2009) Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. *Addiction biology* **14**: 43-64.
- UHL G.R., HALL F.S., SORA I. (2002) Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Molecular psychiatry* **7**: 21-26.
- UJIKE H., SAKAI A., NAKATA K., TANAKA Y., KODAKA T., OKAHISA Y., HARANO M., INADA T., YAMADA M., KOMIYAMA T., HORI T., SEKINE Y., IWATA N., SORA I., IYO M., OZAKI N., KURODA S. (2006) Association study of the dihydropyrimidinase-related protein 2 gene and methamphetamine psychosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1074**:90-96.
- UniProtKB/Swiss-Prot 2010 en: www.uniprot.org/uniprot/Q14894 Acceso: Noviembre de 2010.
- UniProtKB/Swiss-Prot en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5RKI0>. Acceso: diciembre de 2010.
- UNTERWALD E.M., COX B.M., KREEK M.J., COTE T.E. IZENWASSER S. (1993) Chronic repeated cocaine administration alters basal and opioid-regulated adenylyl cyclase activity. *Synapse* **15**: 33-38).
- UNTERWALD E.M., KREEK M.J., CUNTAPAY M. (2001) The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations. *Brain research* **900**: 103-109.
- UYS J.D., LALUMIERE R.T. (2008) Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS & neurological disorders drug targets* **7**: 482-491.
- VALTORTA F, BENFENATI F, GREENGARD P. (1992) Structure and function of the synapsins. *The Journal of biological chemistry* **267**: 7195-7198.
- VAN AELST L., D'SOUZA-SCHOREY C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes & development* **11**: 2295-2322.
- VAN DONGEN Y.C., DENIAU J.M., PENNARTZ C.M., GALIS-DE GRAAF Y., VOORN P., THIERRY A.M., GROENEWEGEN H.J. (2005) Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* **136**: 1049-1071.

- VANDERSCHUREN L.J., DE VRIES T.J., WARDEH G., HOGENBOOM F.A., SCHOFFELMEER A.N. (2001) A single exposure to morphine induces long-lasting behavioural and neurochemical sensitization in rats. *The European journal of neuroscience* **14**: 1533-1538.
- VAWTER M.P., THATCHER L., USEN N., HYDE T.M., KLEINMAN J.E., FREED W.J. (2002) Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular psychiatry* **7**: 571-578.
- VOLKOW N.D., FOWLER J.S., WANG G.J., SWANSON J.M. (2004) Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Molecular psychiatry* **9**: 557-69.
- VOLKOW N.D., WANG G.J., BEGLEITER H., PORJESZ B., FOWLER J.S., TELANG F., WONG C., MA Y., LOGAN J., GOLDSTEIN R., ALEXOFF D., THANOS P.K. (2006) High levels of dopamine D2 receptors in unaffected members of alcoholic families: possible protective factors. *Archives of general psychiatry* **63**: 999-1008.
- VOLKOW N.D., FOWLER J.S., WANG G.J., HITZEMANN R., LOGAN J., SCHLYER D.J., DEWEY S.L., WOLF A.P. (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* **14**: 169-177.
- WALLIMANN T., HEMMER W. (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **133-134**: 193-220.
- WANG P., BOUWMAN F.G., MARIMAN E.C. (2009) Generally detected proteins in comparative proteomics--a matter of cellular stress response? *Proteomics* **9**: 2955-2966.
- WASHBURN M.P., WOLTERS D., YATES III J.R. (2001) Largescale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* **19**: 242-247.
- WEI X., LI L. (2009) Mass spectrometry-based proteomics and peptidomics for biomarker discovery in neurodegenerative diseases. *International journal of clinical and experimental pathology* **2**: 132-148.
- WEINSHENKER D., SCHROEDER J.P. (2007). There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1433-1451.
- WEISS F., MARKOU A., LORANG M.T., KOOB G.F. (1992) Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain research* **593**: 314-318.
- WHEELOCK A.M., BUCKPITT A.R. (2005) Software-induced variance in twodimensional gel electrophoresis image analysis. *Electrophoresis* **26**: 4508-4520.
- WHEELOCK A.M., GOTO S. (2006) Effects of post-electrophoretic analysis on variance in gel-based proteomics. *Expert Review of Proteomics* **3**: 129-142.
- WILKINS M.R. SANCHEZ J.C., GOOLEY A.A., APPEL R.D., HUMPHERY_SMITH I., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L (1995) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **13**: 19-50.
- WILLIAMS J.T., CHRISTIE M.J., MANZONI O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological reviews* **81**: 299-343.
- WILLIAMS M.T., BROWN R.W., VORHEES C.V. (2004) Neonatal methamphetamine administration induces region-specific long-term neuronal morphological changes in the rat hippocampus, nucleus accumbens and parietal cortex. *The European journal of neuroscience* **19**: 3165-3170.

- WILSON M.C., SCHUSTER C.R. (1974) Aminergic influences on intravenous cocaine self-administration by Rhesus monkeys. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2**: 563-571.
- WISE R.A., LEONE P., RIVEST R., LEEB K. (1995b) Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. *Synapse* **21**:140-148.
- WITZMANN F.A., LI J., STROTHER W.N., MCBRIDE W.J., HUNTER L., CRABB, D.W., LUMENG L., LI T.K. (2003). Innate differences in protein expression in the nucleus accumbens and hippocampus of inbred alcohol-preferring and –nonpreferring rats. *Proteomics* **3**: 1335–1344.
- WOLF M.E., SUN X., MANGIAVACCHI S., CHAO S.Z. (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* **47**: 61-79.
- WOOLVERTON W.L. (1986) Effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on the self-administration of cocaine and pibredil by rhesus monkeys. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **24**: 531-535.
- WU G.J., WEN Z.H., CHEN W.F., CHANG Y.C., CHERNG C.H., WONG C.S. (2007) The effect of dexamethasone on spinal glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase expression in morphine-tolerant rats. *Anesthesia and analgesia* **104**: 726-730.
- XIAO S., WANG Q., JIA J., CONG P., MO D., YU X., QIN L., LI A., NIU Y., ZHU K., WANG X., LIU X., CHEN Y. (2010) Proteome changes of lungs artificially infected with H-PRRSV and N-PRRSV by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *Virology journal* **7**: 107.
- XIE T., TONG L., BARRETT T., YUAN J., HATZIDIMITRIOU G., MCCANN U.D., BECKER K.G., DONOVAN D.M., RICAURTE G.A. (2002) Changes in gene expression linked to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 274-283.
- XU N.J., YU Y.X., ZHU J.M., LIU H., SHEN L., ZENG R., ZHANG X., PEI G. (2004) Inhibition of SNAP-25 phosphorylation at Ser187 is involved in chronic morphine-induced down-regulation of SNARE. *The Journal of biological chemistry* **279**: 40601-40608.
- XUE S., JIA J. (2006) Genetic association between Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase-L1 gene S18Y polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Chinese Han population. *Brain research* **1087**: 28-32.
- YAMADA K., NOGUCHI T. (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *The Biochemical journal* **337**: 1-11.
- YAMAMOTO B.K., BANKSON M.G. (2005) Amphetamine neurotoxicity: Cause and consequence of oxidative stress. *Critical reviews in neurobiology* **17**: 87–117.
- YANG L., SUN Z.S., ZHU Y.P. (2007). Epub 2007 Apr 20. Proteomic analysis of rat prefrontal cortex in three phases of morphine-induced conditioned place preference. *Journal of proteome research* **6**: 2239-2247.
- YANG M.H., KIM S., JUNG M.S., SHIM J.H., RYU N.K., YOON Y.J., JANG C.G., BAHK Y.Y., KIM K.W., PARK J.H. (2008) Proteomic analysis of methamphetamine-induced reinforcement processes within the mesolimbic dopamine system. *Addiction biology* **13**: 287-294.
- YEOM M., SHIM I., LEE H. J., HAHM D. H. (2005) Proteomic analysis of nicotine-associated protein expression in the striatum of repeated nicotine-treated rats. *Biochemical and biophysical research communications* **326**: 321–328.

VII. Bibliografía

- ZHOU W., LIU H., ZHANG F., TANG S., ZHU H., LAI M., KALIVAS P.W. (2007) Role of acetylcholine transmission in nucleus accumbens and ventral tegmental area in heroin-seeking induced by conditioned cues. *Neuroscience* **144**: 1209-1218.
- ZHU B.L., ISHIKAWA T., MICHIEUE T., LI D.R., ZHAO D., BESSHO Y., KAMIKODAI Y., TSUDA K., OKAZAKI S., MAEDA H. (2007) Postmortem cardiac troponin I and creatine kinase MB levels in the blood and pericardial fluid as markers of myocardial damage in medicolegal autopsy. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* **9**: 241-250.
- ZITO K.A., VICKERS G., ROBERTS D.C. (1985) Disruption of cocaine and heroin self-administration following kainic acid lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **23**: 1029-1036.
- ZOLNIEROWICZ S., BOLLEN M. (2000) Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19–24, 1999. *EMBO* **19**: 483–488.