



**FACULTAT DE PSICOLOGIA
DEPARTAMENT DE PSICOBIOLOGIA**

**EVALUACIÓN DE LAS
CONSECUENCIAS CONDUCTUALES
DE LA EXPOSICIÓN AL BUPROPIÓN
EN LA ADOLESCENCIA Y EDAD
ADULTA EN RATONES**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

M^a Carmen Gómez Lozano

Dirigida por

Dra. Rosa Redolat Iborra

Dra. Carmen Carrasco Pozo

A mis padres, hijos y nieto

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que han estado presentes durante este proyecto.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis tutoras Rosa y Carmen por su ánimo y buena predisposición en todo momento, y sobre todo cuando más necesitaba de ellas, sin poner obstáculos o darme negativas, sino todo lo contrario.

Un agradecimiento especial a mis compañeros Inés, Paloma y José, por su tiempo, paciencia y apoyo, por escucharme y aconsejarme siempre que lo he necesitado y hacer más llevadero las dificultades con las que me he ido encontrando.

Agradecer hoy y siempre a mi familia, especialmente a mis hijos Esther y José Vicente, porque desde el primer momento me brindaron todo su apoyo, colaboración y cariño sin ningún interés, y por estar a mi lado cada día durante estos años.

En general, quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta Tesis Doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que les agradezco todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo el cariño y amistad.

I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ASPECTOS GENERALES E INDICACIONES CLÍNICAS DEL BUPROPIÓN	
2.1. Farmacología y mecanismo de acción	6
2.2. Indicaciones clínicas	11
2.3. El bupropión como tratamiento para dejar de fumar	15
3. ACCIONES CONDUCTUALES DEL BUPROPIÓN EN MODELOS ANIMALES	21
3.1. Efectos del bupropión sobre la actividad motora	22
3.2. Efectos del bupropión sobre el aprendizaje y la memoria	23
3.3. Efectos del bupropión sobre la ansiedad, la conducta exploratoria y la búsqueda de la novedad	25
3.4. Efectos del bupropión sobre la conducta de interacción social	26
4. EFECTOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE BUPROPIÓN Y NICOTINA	27

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

III. PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIO 1. INFLUENCIA DEL BUPROPIÓN EN TAREAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA	43
EXPERIMENTO 1: EFECTOS DEL BUPROPIÓN SOBRE EL CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA	
1. Material y método	47
2. Análisis estadístico	50
3. Resultados	50
4. Discusión	56

EXPERIMENTO 2: EFECTOS DEL BUPROPIÓN SOBRE
EL APRENDIZAJE ESPACIAL

1. Material y método	59
2. Análisis estadístico	61
3. Resultados	62
4. Discusión	64

ESTUDIO 2. INFLUENCIA DEL BUPROPIÓN SOBRE EL NIVEL DE ANSIEDAD	67
---	----

EXPERIMENTO 3: EFECTOS DE LA NICOTINA SOBRE LA
CONDUCTA EXPLORATORIA Y LA BÚSQUEDA DE LA NOVEDAD

1. Material y método	71
2. Análisis estadístico	73
3. Resultados	74
4. Discusión	79

EXPERIMENTO 4: INTERACCIÓN ENTRE BUPROPIÓN Y
NICOTINA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA
EXPLORATORIA Y LA BÚSQUEDA DE LA NOVEDAD EN RATONES
ADOLESCENTES Y ADULTOS

1. Material y método	83
2. Análisis estadístico	85
3. Resultados	85
4. Discusión	90

EXPERIMENTO 5: INTERACCIÓN ENTRE BUPROPIÓN Y
NICOTINA: EFECTOS SOBRE LA ANSIEDAD EN RATONES
ADOLESCENTES Y ADULTOS

5.1 Material y método	93
5.2 Análisis estadístico	95
5.3 Resultados	95
5.4 Discusión	101

ESTUDIO 3: INFLUENCIA DEL BUPROPIÓN SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL

EXPERIMENTO 6: EFECTOS DE LA COADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE BUPROPIÓN Y NICOTINA SOBRE LA CONDUCTA DE

INTERACCIÓN SOCIAL 107

1. Material y método 111

2. Análisis estadístico 116

3. Resultados 117

4. Discusión 122

EXPERIMENTO 7: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL BUPROPIÓN Y LA NICOTINA SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL EN RATONES DE DIFERENTES EDADES

1. Material y método 127

2. Análisis estadístico 128

3. Resultados 128

4. Discusión 141

EXPERIMENTO 8: CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y EFECTOS DEL BUPROPIÓN SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL

1. Material y método 145

2. Análisis estadístico 148

3. Resultados 148

4. Discusión 157

IV. DISCUSIÓN GENERAL 165

V. CONCLUSIONES 181

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 187

La presente Tesis tiene como tema central el estudio del perfil conductual del bupropión en ratones. El bupropión es un antidepresivo con un perfil farmacológico complejo y que ha demostrado ser también eficaz en el tratamiento de la dependencia del tabaco, incluyéndose entre los siete agentes farmacológicos de primera línea para ayudar a dejar de fumar. A pesar de ello, todavía se desconocen muchos aspectos del perfil conductual de este fármaco. Por ello, nos planteamos investigar los efectos cognitivos y emocionales del bupropión mediante la aplicación de modelos animales. En este trabajo se ha evaluado la influencia del fármaco sobre la capacidad de aprendizaje y memoria implícita y explícita en ratones. También se han valorado los efectos del fármaco sobre la búsqueda de novedad, la ansiedad y la interacción social y, además, se han examinado si los posibles efectos del tratamiento con bupropión y nicotina difieren en ratones de diferentes edades.

De acuerdo con este objetivo general, este trabajo se ha dividido en 6 capítulos. En el primer capítulo se plantea el marco teórico de la presente Tesis Doctoral, abordando una revisión acerca de los principales aspectos relacionados con el tratamiento farmacológico con bupropión en humanos; la farmacología y el mecanismo de acción de este fármaco y sus posibles aplicaciones terapéuticas para ayudar a dejar de fumar. Dentro de este marco teórico introductorio se presentan también los efectos del bupropión y la nicotina en diferentes modelos animales, así como los escasos estudios que han valorado el efecto de la administración conjunta de ambas sustancias.

Tras definir el marco teórico, en el capítulo II se concretan los objetivos e hipótesis que han guiado esta investigación. El capítulo III se dedica a presentar la parte experimental del presente trabajo. Con el objetivo de conseguir una exposición más clara de la investigación realizada, los ocho experimentos incluidos en la Tesis se agrupan en tres estudios experimentales. El desarrollo de estos estudios ha comportado el manejo de un gran número de animales (1535), la utilización de distintos modelos animales y la aplicación de protocolos experimentales que en general conllevan un extenso trabajo de laboratorio.

En el primer estudio se analizaron los efectos del bupropión en dos tareas de aprendizaje y memoria en ratones NMRI, para lo que se diseñaron dos experimentos. Inicialmente se valoró la influencia del fármaco sobre la tarea de condicionamiento de evitación activa (Experimento 1) y seguidamente se investigaron los efectos del

bupropión sobre el aprendizaje y la memoria espacial, mediante el modelo del laberinto de agua en ratones adolescentes y adultos (Experimento 2).

En el segundo estudio se abordaron los efectos del bupropión y la nicotina sobre la conducta exploratoria y la búsqueda de novedad, así como sobre el nivel de ansiedad, para lo que se realizaron tres experimentos. En el primero de ellos (Experimento 3), se evaluó la acción de la nicotina en test conductual de la tabla de agujeros o *hole board* en ratones de diferentes edades. En los siguientes experimentos (Experimentos 4 y 5) se estudió el efecto de la interacción entre nicotina y bupropión en roedores adolescentes y adultos empleando la tabla con agujeros o *hole board* y el laberinto elevado en forma de cruz o *plus-maze*.

El tercer estudio se centró en determinar si la administración conjunta de bupropión y nicotina modula las interacciones sociales en ratones OF1 adultos mantenidos agrupados en condiciones de alojamiento estándar (Experimento 6). El experimento 7 tuvo como objetivo determinar si el tratamiento con bupropión o nicotina, modificaba los niveles de conducta agresiva mostrada por los animales cuando se enfrentan a un oponente estándar no agresivo. Con esta finalidad los animales utilizados en este experimento (ratones OF1 adolescentes y adultos) permanecieron aislados hasta la realización de los encuentros sociales. En base a los resultados obtenidos en este experimento nos propusimos como último objetivo específico evaluar si las condiciones de alojamiento y el tratamiento con bupropión influyen en las interacciones sociales, y en particular sobre la conducta agresiva, en ratones adultos (Experimento 8).

Una vez descrita la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, en el capítulo IV se discuten los resultados obtenidos en los distintos experimentos y en el capítulo V se resumen las conclusiones más relevantes del presente trabajo. Finalmente, en el capítulo VI se recogen las referencias bibliográficas de las citas que aparecen en el trabajo.

Para finalizar esta presentación, deseo indicar que los datos obtenidos en los experimentos 6 y 7 han dado origen a dos publicaciones en revistas especializadas JCR. Actualmente los datos del experimento 1 se encuentran pendientes de revisión en una revista JCR. Además, gran parte del trabajo experimental ha sido presentado a congresos nacionales e internacionales de reconocido prestigio.

I.- MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

1. INTRODUCCIÓN

El interés del presente trabajo se centra principalmente en evaluar la respuesta conductual al bupropión. Este fármaco se utiliza como antidepresivo y para ayudar a dejar de fumar, aunque numerosas investigaciones indican que el bupropión posee un amplio espectro, con múltiples aplicaciones terapéuticas cuando es utilizado en monoterapia o combinado con otros agentes farmacológicos.

A nivel clínico, en trastornos mentales como la depresión o la ansiedad se ha puesto de manifiesto que el tratamiento con bupropión resulta eficaz (Thakkar y cols., 2013). La co-administración de antidepresivos y agentes antipsicóticos en pacientes que sufren esquizofrenia se ha visto avalada por la evidencia de que en dicha patología se combinan diferentes sistemas de neurotransmisión. En este sentido, se han publicado diferentes estudios que evalúan la efectividad del tratamiento con bupropión en los síntomas negativos de la esquizofrenia (afectividad embotada, abulia, anhedonia y atención deteriorada) (Xiongjun y cols., 2014). La sintomatología negativa es resistente a la terapia antipsicótica lo que conlleva un impacto significativo en la vida de los pacientes. Por esta razón, se ha evaluado la posible utilidad terapéutica de otros fármacos con diferentes propiedades farmacológicas, como es el caso del bupropión. Este agente, ejerce sus efectos como antagonista del receptor nicotínico y tradicionalmente se ha prescrito a pacientes esquizofrénicos para ayudar a dejar de fumar (Rezaee y Akbarpour, 2012). No obstante, en las investigaciones realizadas hasta el momento, los resultados del tratamiento con bupropión en la mejora de los síntomas negativos de la esquizofrenia resultan contradictorios (Rezaee y Akbarpour, 2012). Una explicación plausible a este hecho podría ser el diferente grado de severidad en los síntomas negativos de la enfermedad que presentan los pacientes incluidos en los estudios (Yassini y cols., 2014).

También se ha planteado más recientemente la posible utilidad del bupropión en otros trastornos como el Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad en el que los síntomas están asociados con algunas deficiencias tales como dificultades en el mantenimiento de la atención, gestión del tiempo, y la organización de actividades tanto en niños como en adultos (Hamedi y cols., 2014). El TDAH en la infancia se asocia con un incremento del riesgo de consumo y dependencia a la nicotina, el alcohol o demás drogas de abuso (Lee y cols., 2011). El TDAH en adultos se asocia con comorbilidades tales como los trastornos de ansiedad, la

depresión, los trastornos por uso de sustancias, trastornos de la personalidad y trastorno de la personalidad antisocial. El tratamiento con bupropión es considerado una buena opción para el tratamiento del TDAH, tanto en niños como en adultos (Hamedi y cols., 2014), resultando tan eficaz como el metilfenidato. Además, se considera que el bupropión tiene una aceptable tolerabilidad (Maneeton y cols., 2014).

Por otra parte, el bupropión es empleado con éxito en la deshabituación tabáquica, habiéndose demostrado que un número significativo de personas fumadoras presentan tras el tratamiento una abstinencia mantenida en el tiempo (Ebbert y cols., 2014) aliviando los síntomas desagradables que se producen durante el síndrome de abstinencia a la nicotina, como la irritabilidad o la ansiedad. Diferentes investigaciones en este ámbito han puesto de relieve la importancia de combinar fármacos que ejercen sus acciones sobre diferentes dianas moleculares y sistemas reguladores con el fin de obtener tratamientos más eficaces (Heal y cols., 2012). Hay que recordar, además, que en el abuso de drogas intervienen factores sociales, familiares y ambientales, por lo que el tratamiento generalmente resulta complejo (Mori y cols., 2013). En el caso de la nicotina se trata de una sustancia adictiva muy nociva para la salud. Las personas dependientes de la nicotina sienten la necesidad compulsiva de consumirla y se genera tolerancia y dependencia, así como síndrome de abstinencia al cesar su consumo. A nivel mundial, el consumo de tabaco es hoy día la principal causa de enfermedades y muertes evitables, según el Informe de la OMS sobre la epidemia mundial del tabaquismo (2013).

Con el fin de encontrar tratamientos más eficaces para ayudar a erradicar esta adicción, múltiples estudios han puesto de manifiesto que la combinación del bupropión con distintos fármacos incrementa la abstinencia tabáquica. Tanto la combinación de bupropión de liberación sostenida con el tratamiento sustitutivo de nicotina (Hugues y cols., 2014), como la combinación de bupropión y vareniclina, un agonista parcial del receptor nicotínico de acetilcolina (Hall y cols., 2015), resultan más eficaces que cuando se emplean estos fármacos en monoterapia. No obstante, algunos pacientes que recibieron el tratamiento de bupropión y vareniclina informaron de un mayor número síntomas depresivos en comparación con los que solo recibieron vareniclina. Estos efectos adversos revelan que hay que tener cautela con la combinación de fármacos la hora de ayudar a dejar de fumar (Hong y cols., 2015).

Un aspecto que resulta de gran interés es que en los estudios iniciales acerca de la posible utilidad del bupropión como tratamiento farmacológico para ayudar a dejar de fumar ya se advirtió que este fármaco no provocaba un incremento de peso en los fumadores. Posteriores trabajos han confirmado que el bupropión es además un tratamiento eficaz para la obesidad, tanto administrado solo como cuando se combina con otros fármacos. Investigaciones preclínicas indican que el bupropión en monoterapia causa una disminución de peso en ratones debido probablemente a un incremento de la actividad motora y de la termogénesis, sin disminuir el consumo de comida (Billes y Cowley, 2008). Recientemente, Clapper y colaboradores (2013) utilizaron bupropión, amilina y naltrexona por sus efectos adelgazantes y observaron un efecto aditivo y sinérgico de los tratamientos, de manera que disminuían el consumo de comida, el peso y la adiposidad. En estudios clínicos con sujetos humanos las investigaciones sugieren que la formulación de liberación sostenida de bupropión, en combinación con naltrexona, causa una disminución significativa del peso (5-15%), lo que supone una reducción mayor que cuando se emplea un único tratamiento (Wadden y cols., 2011), resultando eficaz en el consumo compulsivo de comida, al controlar la ingesta de alimentos y el peso corporal.

También se ha sugerido que el tratamiento con bupropión resulta efectivo en conductas potencialmente desadaptativas relacionadas con los circuitos de impulsividad-compulsividad (Stahl, 2013), tanto las clasificadas como adicción a sustancias químicas como aquellas producidas por conductas compulsivas. No obstante, el uso del bupropión como tratamiento para ayudar a pacientes que sufren adicciones a sustancias de abuso diferentes a la nicotina resulta controvertido (Dwoskin y cols., 2006). Se ha encontrado que este fármaco es eficaz para superar la adicción a psicoestimulantes (Castells y cols., 2010). De hecho, el bupropión se está considerando como “terapia agonista” para el tratamiento de abuso de psicoestimulantes (Mori y cols., 2013). Por ejemplo, actualmente se utiliza el bupropión en el tratamiento de personas dependientes a las metanfetaminas, ya que aumenta el número de semanas que se mantienen abstinentes los pacientes (McCann y Li, 2012). Asimismo, dicho fármaco se está aplicando para aliviar el síndrome de abstinencia que se produce tras el abandono del consumo de cannabis (Penetar y cols., 2012) o de cocaína (Vento y cols., 2013). Entre las adicciones comportamentales, destaca la eficacia del bupropión para el tratamiento de la ludopatía, o para tratar la adicción a internet (Han y Renshaw, 2012). En general, este fármaco podría ser útil en conductas relacionadas con la

liberación de dopamina y la estimulación del sistema de recompensa cerebral (Stahl., 2014; Han y Renshaw, 2012).

A pesar del interés psicofarmacológico del bupropión, todavía se conoce relativamente poco sobre los cambios neurobiológicos y conductuales subyacentes a sus efectos terapéuticos. A continuación pasamos a describir sus características farmacológicas.

2. ASPECTOS GENERALES E INDICACIONES CLÍNICAS DEL BUPROPIÓN

2.1. Farmacología y mecanismo de acción

Farmacología

El bupropión comparte algunas propiedades estructurales, neuroquímicas y conductuales con los psicoestimulantes clásicos como la cocaína o las anfetaminas. Estas propiedades le confieren aplicaciones terapéuticas únicas, además de su eficacia antidepressiva (Maneeton y cols., 2013; Rauhut y cols., 2003).

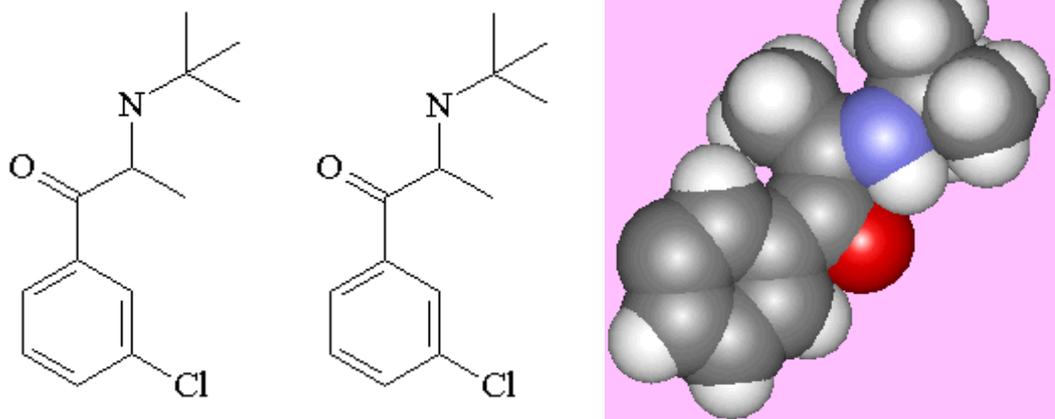


Figura 1. Estructura química y molécula del bupropión.

Este fármaco se administra por vía oral y se absorbe en el tubo digestivo, sin que la ingesta de alimentos interfiera de modo significativo, con una biodisponibilidad del 87%. La concentración máxima plasmática se alcanza a las 6 horas tras su administración y su vida media de eliminación es aproximadamente de 20 horas. Existen tres formulaciones disponibles: liberación inmediata (requiere tres tomas al día), liberación sostenida (dos tomas al día) y liberación extendida (una vez al día). La formulación de una vez al día se

desarrolló con el objetivo de mejorar la tolerabilidad y adherencia al tratamiento con bupropión. La dosis recomendada para la deshabituación tabáquica es de 150 mg/día dos veces al día, comenzando una o dos semanas antes de la fecha fijada para dejar de fumar. Los primeros 5-7 días se administra una dosis de 150 mg por la mañana y trascurridos esos días se puede añadir la segunda dosis de 150 mg, 8 horas después de la primera (para evitar el insomnio). La duración recomendada del tratamiento es de 7 a 9 semanas (Hernández-Lozano y cols., 2010).

Los estudios de farmacocinética del bupropión han identificado en plasma tres metabolitos activos: *hidroxibupropión* (HB) y los isómeros aminoalcohólicos *treohidrobupropión* (TB) y *eritrohidrobupropión* (EB). Sus concentraciones en plasma son tan elevadas como las del propio fármaco. *In vitro*, el bupropión se metaboliza principalmente en hidroxibupropion mediante el enzima CYP2B6. Su concentración presente en el líquido cerebrospinal es seis veces mayor que el del fármaco primario (Cooper y cols., 1984) por lo que a este metabolito se le atribuyen buena parte de los efectos clínicos. La vida media del bupropión y sus metabolitos activos es de 20 a 37 horas. Una vez ya inactivos, son excretados principalmente por la orina (Hernández-Lozano y cols., 2010).

Se considera que el metabolito HB desempeña un papel crítico en la actividad antidepresiva del bupropión, puesto que aparece asociado con sus efectos noradrenérgicos a largo plazo (Ramasubbu, 2002). También el sistema dopaminérgico interviene en sus propiedades antidepresivas. Este fármaco disminuye la transmisión gabaérgica a las neuronas dopaminérgicas y, de ese modo, descende la inhibición tónica de estas neuronas (Daviss y cols., 2005). Se considera que el incremento en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas durante el tratamiento podría contribuir a su acción antidepresiva y ayudar a reducir las recaídas en los sujetos que quieren dejar de fumar. Sin embargo, los efectos antidepresivos del bupropión no parecen estar mediados directamente por la actividad serotoninérgica (Ascher y cols., 1995).

Estudios clínicos han demostrado que el bupropión también es eficaz en pacientes jóvenes que sufren trastornos afectivos. Asumiendo las diferencias en el tejido adiposo, talla, niveles hormonales y de metabolización según la edad, las propiedades farmacocinéticas del bupropión pueden diferir en adultos y adolescentes. En este sentido, Daviss y colaboradores (2005) observaron que en los jóvenes el bupropión era metabolizado más rápidamente que

en los adultos, en particular los metabolitos activos de HB y, en menor medida, los TB y EB. También encontraron que los niveles en sangre de estos metabolitos variaban linealmente con la dosis de bupropión (Daviss y cols., 2005).

Mecanismo de acción

Se ha propuesto un doble mecanismo de acción para el bupropión que se relaciona con la acción combinada tanto sobre la recaptación de noradrenalina y dopamina como con la inhibición selectiva de estos transportadores en el sistema mesolímbico y en el núcleo accumbens (Billes y Cowley, 2008), con un mínimo efecto sobre la recaptación de serotonina y sin inhibir la acción de ninguna monoaminoxidasa (Paterson y cols., 2007). Además, se ha observado indirectamente una mejora en la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas, a través de la activación del flujo descendente de noradrenalina (Saiz y cols., 2011). Así, la administración de bupropión bloquea la bomba de recaptación de noradrenalina y dopamina, aumentando de esta forma los niveles de neurotransmisión dopaminérgica. Además, su mecanismo de acción podría implicar la liberación presináptica de noradrenalina y dopamina (Stahl, 2013).

El efecto estimulante del bupropión se atribuye en mayor medida a la noradrenalina y las propiedades reforzantes a la dopamina. Teniendo en cuenta la base de su estructura química y las propiedades farmacológicas, algunos autores han propuesto que el bupropión puede ejercer efectos psicotrópicos estimulantes y conllevar riesgo de abuso. Si bien este fármaco tiene una acción débil sobre la dopamina y es un inhibidor del transportador de la noradrenalina in vitro en comparación con otras sustancias psicoestimulantes (Simmler y cols., 2013), por lo general en sujetos humanos no tiene efectos psicoestimulantes o gratificantes cuando se usa por vía oral y a dosis terapéuticas. Sin embargo, se ha encontrado que puede crear adicción cuando el bupropión se administra por vía intranasal (Yoon y Westermeyer, 2013) o en dosis altas (Costa y cols., 2015).

A nivel neuroanatómico, algunas investigaciones indican que el bupropión ejerce gran parte de su acción en diversas estructuras cerebrales, siendo una de ellas el estriado dorsal, probablemente el principal centro modulador que integra la información sensoriomotora, cognitiva y motivacional que lleva a procesos de toma de decisión y su correspondiente

conducta motora (Kimchi y cols., 2009). Santamaria y Arias (2010) encontraron que el bupropión modula la liberación de neurotransmisores en el estriado dorsal induciendo actividad motora en ratas. Además, Nomikos y colaboradores (1989) ya habían confirmado previamente que el efecto agudo del fármaco incrementaba las concentraciones de dopamina y sus metabolitos en el estriado y en el núcleo accumbens, correlacionando dicho pico con las conductas estereotipadas de los animales y con la actividad motora en ratas. El bupropión también modula la liberación de dopamina y de glutamato en el estriado dorsal. Dicha modulación se asocia a los efectos excitatorios iniciales mediados por el fármaco. También se ha observado que el efecto inicial estimulante del glutamato se desvanece con la administración a largo plazo de bupropión. Estos resultados cuestionan la posible relación entre cambios en los niveles de glutamato y el efecto excitotóxico que se produce tras un tratamiento a largo plazo con bupropión. De hecho, la ingestión de altas dosis de bupropión puede causar graves problemas de salud, especialmente atribuibles a su efecto convulsionante (Pesola y Avasarala, 2002)

El tratamiento tanto agudo como crónico de bupropión también puede tener efectos sobre el locus coeruleus y el rafe dorsal (ver Figura 2). Investigaciones experimentales han confirmado que el bupropión administrado agudamente (dosis de 30 mg/kg/día durante 2 días) reduce la tasa de disparo de las neuronas del locus coeruleus, de forma dosis-dependiente, sin producir cambios en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (Dong y Blier, 2001). Estas acciones ponen de manifiesto una acción presináptica noradrenérgica, aunque este efecto tiende a desaparecer cuando el tratamiento se prolonga 14 días, lo que refleja la desensibilización de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos. La administración de bupropión en el rafe dorsal de la rata incrementa hasta en un 40% la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas, y esta tasa se mantiene cuando el régimen se prolonga durante 14 días. Se hipotetiza que dicho efecto estaría mediado por la desensibilización de los autoreceptores 5-HT_{1A} (El Mansari y cols., 2008).

Por otro lado, los estudios realizados mediante resonancia magnética han confirmado que el bupropión produce activación neuronal en áreas cerebrales relacionadas con la atención (corteza prefrontal, giro frontal inferior y núcleo caudado derecho) y disminución en la actividad de la amígdala (Robertson y cols., 2007). Dichas observaciones apuntan a que este fármaco activa las funciones ejecutivas y atenúa las relacionadas con las emociones,

por lo que estaría recomendado en pacientes depresivos con predominio de síntomas neurocognitivos. También se ha sugerido que este fármaco puede mejorar el enlentecimiento cognitivo y la pseudodemencia depresiva (Stahl, 2013).

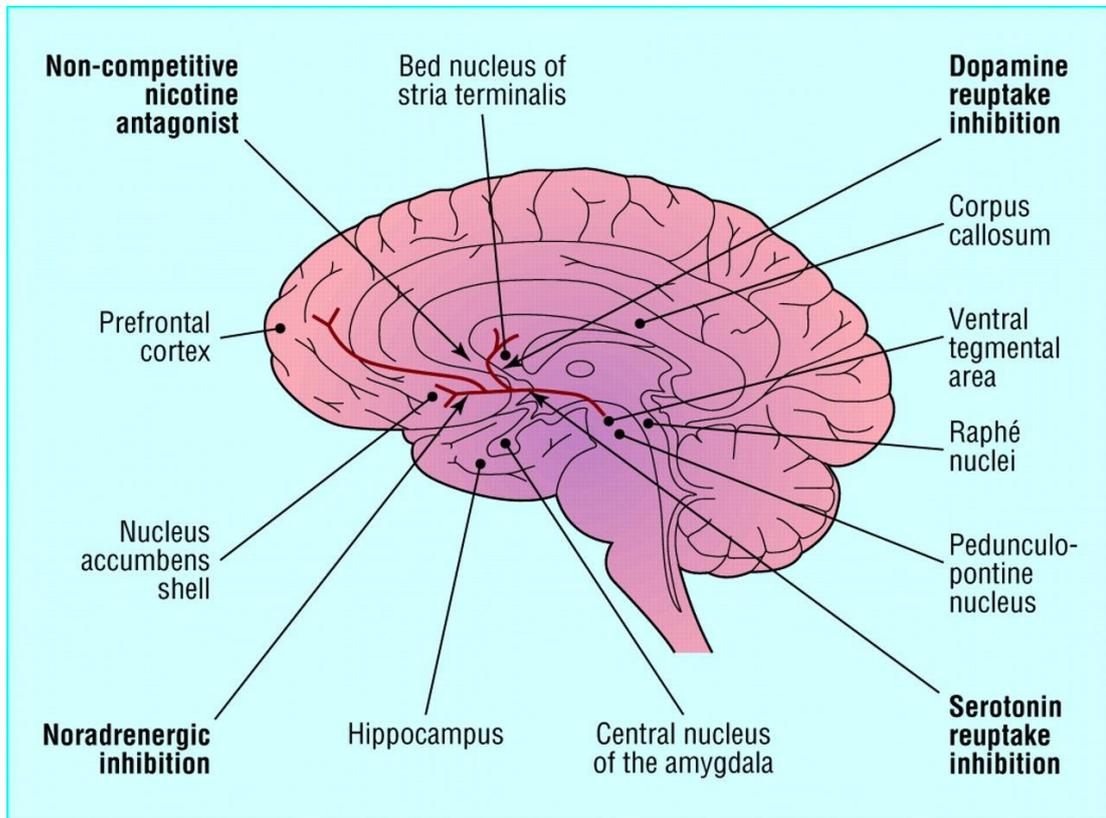


Figura 2. Mecanismo de acción del bupropión (Tomado de Alentorn y cols., 2010).

Una de las teorías aceptadas sobre la etiología de la depresión es la hipótesis colinérgica-adrenérgica. De acuerdo con esta hipótesis, la hiperactividad o hipersensibilidad del sistema colinérgico sobre el sistema adrenérgico puede conducir a estados de ánimo depresivos (Shytle y cols., 2002). Por lo tanto, los antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) pueden reducir los síntomas de la depresión. Los estudios *in vitro* han demostrado que el bupropión y otros antidepresivos poseen efectos antagonistas sobre los nAChR neuronales (Arias y cols., 2010). Es posible que el efecto antidepresivo del bupropión se encuentre parcialmente mediado por su acción antagonista sobre el nAChR. Además, se considera que la subunidad $\beta 4$ desempeñaría un papel modulador en el efecto

antidepresivo tras la administración crónica del bupropión (Radhakrishnan y cols., 2013).

Por otro lado, el mecanismo de acción del bupropión para dejar de fumar no se ha clarificado completamente, aunque la efectividad de este fármaco para inducir abstinencia a la nicotina parece ser independiente de sus propiedades antidepresivas (Paterson, 2009). Se ha sugerido que su eficacia en el tratamiento de la dependencia a la nicotina puede estar relacionado con su actividad como antagonista nicotínico. Numerosos estudios han confirmado que el bupropión y sus metabolitos actúan como antagonistas no competitivos de los receptores colinérgicos nicotínicos (Pandhare y cols., 2012). Estudios recientes implican a la subunidad $\beta 4$ de los receptores nicotínicos colinérgicos, y en particular los ubicados en la habénula medial, como claves en la adicción a la nicotina y en el posible efecto beneficioso del bupropión para ayudar a dejar de fumar (Grady y cols., 2009). De hecho, la subunidad $\beta 4$ se encuentra involucrada en los síntomas de abstinencia de la nicotina (Salas y cols., 2009).

La adicción a la nicotina está relacionada con la interacción de la nicotina con los receptores nicotínicos y con un aumento de la actividad dopaminérgica en el sistema de refuerzo cerebral (West y cols., 2008). Como ya se ha mencionado el bupropión, administrado crónicamente, favorece un aumento de la concentración de dopamina en el núcleo accumbens. Por ello, se considera que potenciar la liberación de dopamina en dicho núcleo contribuirá de forma beneficiosa a paliar los efectos desagradables del dejar de fumar (Wilkes, 2008). Así mismo, este aumento en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas podría contribuir a la acción antidepresiva del bupropión y a reducir el riesgo de recaídas en las personas que dejan de fumar con este fármaco. Esta comprobado que el bupropión contrarresta tanto los aspectos afectivos, como los somáticos del síndrome de abstinencia a la nicotina (Paterson y cols., 2007).

2.2. Indicaciones clínicas

El bupropión es un medicamento de amplio espectro con múltiples indicaciones terapéuticas: trastorno de depresión mayor, trastorno afectivo-estacional, depresión bipolar, disfunción sexual, trastornos de ansiedad, trastorno por déficit de atención y la adicción a la nicotina. Aunque en el apartado anterior ya se han señalado algunas de las propiedades

terapéuticas del bupropión, a continuación nos centraremos principalmente en destacar las indicaciones clínicas más habituales de este fármaco.

Respecto a sus efectos como antidepresivo, el inicio de su acción terapéutica como antidepresivo no es inmediato, sino que a menudo se retrasa de 2 a 4 semanas. Una vez se produce la remisión completa de los síntomas depresivos, hay que continuar con el tratamiento durante un año para el primer episodio de depresión. Para el segundo y sucesivos episodios de depresión, el tratamiento podría ser indefinido. El perfil terapéutico del bupropión como antidepresivo (Wellbutrin®) es comparable a los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) como la fluoxetina o sertralina (Kavoussi y cols., 1997) o a la venlafaxina (Hewett y cols., 2010), con un mínimo efecto sobre el desempeño neurocognitivo y sobre la actividad sexual. Además, causa menos somnolencia que el ISRS citalopram y no aumenta de modo significativo las concentraciones de ácido úrico o colesterol asociadas generalmente al aumento de peso. Generalmente, el bupropión no es sedante, ni tiene propiedades antihistamínicas. De hecho, su perfil dopaminérgico le confiere propiedades levemente estimulantes. Con frecuencia se tiene en cuenta este efecto estimulante al seleccionar el bupropión para los pacientes con depresión inhibida: el perfil clínico de estos pacientes incluye disminución de la energía, el interés y la existencia de una marcada anhedonia (para una revisión más amplia puede consultarse Goldberg y cols., 2015).

Siguiendo a Stahl (2013), a continuación detallamos brevemente algunos otros posibles usos del bupropión:

- En el tratamiento de episodios depresivos en el trastorno bipolar podría ser eficaz la administración de bupropión. Existen estudios de casos que sugieren que es menos probable que este fármaco induzca a manía o ciclado rápido, aunque los episodios maníacos pueden ocurrir.
- El bupropión también se emplea en el tratamiento de la fobia social (Emmanuel y cols., 1991) y en el trastorno de ansiedad generalizada (Bystritsky y cols., 2008) así como en fumadores que sufren estrés postraumático (Hertzberg y cols., 2001).
- El trastorno afectivo estacional (TAE) consiste en episodios depresivos recurrentes en el otoño/invierno con remisiones en primavera/verano. En la actualidad, el bupropion es el único fármaco aprobado por la FDA para esta indicación.

- Para el uso en niños y adolescentes se deben sopesar riesgos y beneficios del tratamiento farmacológico y monitorizar a los pacientes de manera presencial y regularmente, especialmente en las primeras semanas de tratamiento. Este fármaco ha sido administrado en niños y adolescentes con TDAH, para la depresión y como tratamiento del tabaquismo (Stahl, 2013). En los adolescentes las dosis son similares a las aplicadas generalmente en adultos. En niños puede que la dosis requerida inicial sea más baja, con un máximo de 300 mg/día. Se ha demostrado que este fármaco mejora los síntomas depresivos en adolescentes que sufren depresión mayor (Kosten y Kosten, 2004) y TDAH que no responden a terapias tradicionales o que no toleran sus efectos adversos (Kollins, 2009). En este sentido, se ha encontrado que su administración diaria, durante al menos ocho semanas, promueve un incremento de la atención hasta en un 52% siendo su perfil similar al metilfenidato, resultando seguro, bien tolerado y con una baja tasa de abandono (Wilens y cols., 2001).
- Los estabilizadores del humor o los antipsicóticos atípicos también pueden ser añadidos al tratamiento con bupropión para la depresión psicótica o la depresión resistente al tratamiento. La combinación con mirtazapina o modafinilo pueden ser coadministrados para aliviar los síntomas residuales de depresión o TDAH. El fundamento de estas asociaciones es que teóricamente se están combinando dos mecanismos de acción complementarios.
- El bupropion puede utilizarse como un agente potenciador en combinación con otro grupo de antidepresivos tales como un ISRS o un ISRN. Además, también es útil en pacientes que sufren depresión y trastornos de ansiedad concomitante (Schoevers y cols., 2008).
- Varios estudios han observado que el bupropión puede ser útil en enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn y psoriasis (Hajhashemi y Khanjani, 2014). También se utiliza para mejorar el cuadro denominado *fibro-fog* (dificultades cognitivas asociadas al dolor) en los pacientes con fibromialgia (Stahl, 2013).

Efectos adversos y sobredosificación

Los efectos adversos del bupropión se manifiestan generalmente en un bajo porcentaje de sujetos que lo consumen (Dwoskin y cols., 2006). Cuando se presentan estos efectos pueden ser molestos y presentar riesgos, ya que incluyen taquicardia, hipertensión, insomnio, agitación, temblores y algunos síntomas gastrointestinales, probablemente causados por las acciones de la noradrenalina y la dopamina en ciertas zonas del cerebro. Otros efectos secundarios se relacionaron con las acciones periféricas de la noradrenalina, tales como sequedad de boca, estreñimiento, náuseas y sudoración. Muchos de estos efectos dependen de la dosis (por ejemplo, aumentan cuando lo hace la dosis o reaparecen hasta que se vuelve a desarrollar tolerancia), mientras otros dependen del tiempo (es decir, comienzan inmediatamente al administrar la dosis o cuando la dosis aumenta, pero desaparecen con el tiempo) (Stahl, 2013).

Al igual que otras terapias antidepresivas, el bupropión no debe emplearse en pacientes que padecen convulsiones, han sufrido traumatismo craneal, bulimia, anorexia, o aquellos que abandonan bruscamente el consumo de alcohol, opiáceos o benzodiazepinas, ni en sujetos que están consumiendo antipsicóticos o antidepresivos inhibidores de la monoaminoxidasa. También su uso está limitado en pacientes con enfermedad coronaria (Le Houezec y Aubin, 2013). Su prohibición en trastornos de la conducta alimentaria es debida a un aumento del riesgo de crisis convulsivas observadas en pacientes con bajo peso corporal con una anorexia nerviosa activa que tomaron altas dosis de bupropión de liberación inmediata (Stahl, 2013).

2.3. El bupropión como tratamiento para dejar de fumar

Evitar el consumo de tabaco supone actualmente un reto de salud pública de gran magnitud. Con el objetivo de paliar la mortalidad y morbilidad relacionadas con el tabaquismo, los Estados miembros firmantes del Convenio Marco de la OMS (Junio de 2003) se comprometieron a proteger la salud de su población, asociándose en la lucha contra la epidemia del tabaquismo. El artículo 14 del Convenio Marco para el Control del Tabaco establece que cada país debe aplicar medidas políticas e intervenciones y proveer asistencia para dejar de fumar. Con el fin de ayudar a los países a cumplir los acuerdos de este Convenio Marco, en el año 2008 la OMS estableció un plan (MPOWER), cuya finalidad es ayudar en la planificación, establecimiento y evaluación de alianzas nacionales e internacionales y, al mismo tiempo, facilitar el acceso a los recursos financieros destinados a las actividades de control del tabaco.

En España las medidas que se articularon conforme al Convenio Marco, con el fin de reducir el tabaquismo, quedaron recogidas en la Ley 28/2005, de 26 de diciembre, sobre *“Medidas sanitarias frente al tabaquismo y reguladora de la venta, el suministro, el consumo y la publicidad de los productos del tabaco”*. Esta ley establece entre sus objetivos: las limitaciones en la venta, suministro y consumo de los productos del tabaco, la regulación de su publicidad, promoción y patrocinio, medidas de prevención del tabaquismo, de promoción de la salud y de facilitación de la deshabituación tabáquica, así como el régimen de las infracciones y sanciones. Todas estas medidas se enmarcan en el contexto de las políticas de salud pública que las Administraciones deben promover y tienen que complementarse con programas para hacer frente al tabaquismo. Así, las Administraciones competentes podrán favorecer el desarrollo de programas de investigación, educación, prevención, control del tabaquismo y facilitación de la deshabituación tabáquica. Esta legislación fue modificada en parte por la Ley 42/2010, de 30 de diciembre, ante la necesidad de avanzar en la protección de la salud de los ciudadanos al ampliar la prohibición de fumar en espacios públicos cerrados y colectivos.

La Encuesta Nacional de Salud 2011/12 (ENSE2011) aporta datos sobre prevalencia y otros indicadores de consumo de tabaco en adultos posteriores a la implantación de la Ley 42/2010. Los datos muestran una reducción de la prevalencia de consumo tabaco respecto a la del 2009. Así, la prevalencia de fumadores actuales (diarios y ocasionales) es del 27% en

adultos en 2011, frente al 29,9% de 2009 (según el Informe a las Cortes Generales de Evaluación del Impacto sobre la Salud Pública de la Ley 42/2010).

Es un hecho que dejar de fumar representa para el fumador un proceso difícil, en el que las posibilidades de éxito no están claramente determinadas. Aunque el simple asesoramiento médico para dejar de fumar ya incrementa la tasa de abandono de las personas fumadoras, se ha observado que se produce un incremento de hasta el 30% en las tasas de abstinencia en función del tiempo que el médico pasa con el paciente (Stead y Lancaster, 2012). Una mínima intervención para la adicción al tabaco incluye varios pasos: preguntar, aconsejar, evaluar, asistir y organizar (Guía Clínica de 2014, American Cancer Society). Actualmente existen numerosos tratamientos tanto psicológicos como farmacológicos para ayudar en este proceso de abandono de la adicción a la nicotina. Las estrategias para la deshabituación tabáquica se centran principalmente en el asesoramiento conductual para mejorar la motivación y apoyar los intentos de abandono del tabaco. Las intervenciones farmacológicas intentan reducir las propiedades reforzantes de la nicotina y paliar los síntomas asociados al síndrome de abstinencia. Entre los tratamientos farmacológicos que han demostrado ser eficaces para dejar de fumar destacan actualmente como tratamiento de primera línea: tratamiento sustitutivo con nicotina (TSN), el bupropión y la vareniclina (Van Boven y Verner, 2015). A continuación se expondrán las principales características de cada uno de estos tratamientos farmacológicos.

La TSN fue el primer tratamiento farmacológico de eficacia probada para el tratamiento de la adicción al tabaco. Este tipo de intervención pretende paliar el síndrome de abstinencia ya que el sujeto obtiene la nicotina por una vía diferente a la del cigarrillo, pudiendo ser absorbida a través de la piel, la mucosa bucal o nasal o por la saliva. Recientemente se están empleando los “sistemas electrónicos de administración de nicotina” (SEAN), entre los cuales los cigarrillos electrónicos son el prototipo más común. El cigarrillo electrónico se ha estado comercializando con casi 8000 aromas diferentes, habiendo quedado regulado su uso por la OMS a fecha 27 de febrero de 2005. En España, actualmente el Ministerio de Sanidad se encuentra concretando la regulación del cigarrillo electrónico.

En relación con el bupropión, inicialmente tras ser sintetizado y comercializado, se utilizó como antidepresivo. Sin embargo, actualmente es uno de los fármacos no nicotínicos que se administran para ayudar a dejar de fumar. El inicio de su uso en el tratamiento de la dependencia al tabaco fue, en parte, resultado de la observación anecdótica de que los

pacientes que estaban siendo tratados con este fármaco para la depresión manifestaban con frecuencia que querían dejar de fumar. En España, se comercializó y autorizó su uso como tratamiento de ayuda en la deshabituación tabáquica en Julio del año 2000.

La eficacia del bupropión (Zyntabac® y Quomen®) para dejar de fumar ha sido ampliamente demostrada, tal como ya se ha ido mencionando en las páginas precedentes. Un meta-análisis que incluyó 12 ensayos clínicos randomizados, demostró un *odds ratio* (OR) de 1.82 (CI95% 1,60-2,06) (Cahill y cols., 2013). El tratamiento con 300 mg de bupropión durante dos semanas disminuye algunos de los síntomas del síndrome de abstinencia: irritabilidad, frustración, ansiedad, dificultad de concentración, inquietud y depresión (Cincipirini y cols., 2013). También parece atenuar el incremento de peso que ocurre después de dejar de fumar (Farley y cols., 2012), tanto durante la fase de tratamiento como en la abstinencia (Hays y Ebbert, 2003). Dicha disminución del peso es un factor importante en el éxito del tratamiento ya que muchos fumadores no abandonan el tabaco por miedo al aumento de peso, y en algunos casos dicho incremento puede actuar como un desencadenante que provoque la recaída.

Los estudios clínicos muestran que el bupropión es igual de eficaz en hombres que en mujeres como tratamiento para la adicción al tabaco (Hays y Ebbert, 2003). En un estudio previo se encontró que los fumadores que metabolizaban la nicotina más rápidamente obtenían un mejor resultado en la tasa de abandono que los metabolizadores lentos, quienes tuvieron unas tasas de abandono similares entre el placebo y el bupropión (32%). En cambio, en el grupo de metabolizadores rápidos la tasa de abandono fue del 10% con el placebo y 34% en los tratados con bupropión tras diez semanas de tratamiento. Sin embargo, a los 6 meses de seguimiento, la relación entre la velocidad de metabolismo y el cese se mantuvo similar, no resultando las diferencias ya estadísticamente significativas (Paterson y cols., 2008). Actualmente este fármaco, sólo o combinado con terapia de sustitución con nicotina, está siendo utilizado como tratamiento de primera línea en la farmacoterapia para dejar de fumar (Stead y Lancaster, 2012). Los primeros trabajos ya observaron que el bupropión inducía tasas más altas de abstinencia que el placebo o los parches administrados de forma aislada (Jorenby y cols., 1999).

La vareniclina es el tratamiento más recientemente aprobado por la FDA y la Agencia Europea del Medicamento para dejar de fumar. Este fármaco es un agonista parcial de los receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$. Al ser estimulados estos receptores se produce

la liberación de dopamina en el núcleo accumbens, induciéndose así los efectos placenteros buscados por el fumador. Se considera que actúa mediante un doble mecanismo de acción: aliviando los síntomas de abstinencia y reduciendo los efectos reforzantes de la nicotina. A pesar de que existe cierta controversia en cuanto a la seguridad del bupropión y la vareniclina, la relación beneficio/riesgo resulta positiva (Cahill y cols., 2013). Comparando los efectos de los dos tratamientos farmacológicos no nicotínicos (bupropión vs vareniclina) con respecto al placebo se ha hallado que el tratamiento es efectivo en el 23% de los sujetos tratados con vareniclina y en el 16% de los tratados con bupropión, manteniéndose abstinentes después de un 1 año, en comparación con sólo el 9% de los tratados con placebo (Knight y cols., 2010).

Aunque los tres fármacos anteriormente descritos son los tratamientos que han mostrado mayor eficacia para dejar de fumar, existen otras aproximaciones terapéuticas que también se utilizan para el abandono del tabaco. Por ejemplo, hay una segunda línea de tratamientos farmacológicos entre los que se incluyen la nortriptilina (antidepresivo tricíclico) y la clonidina (agonista α_2 noradrenérgico) (Cahill y cols., 2013). Igualmente, los avances en el conocimiento de la biología molecular de los receptores colinérgicos nicotínicos neuronales están permitiendo el desarrollo de nuevas moléculas con mayor selectividad para cada subtipo de receptor entre los que destaca el receptor nicotínico $\alpha_4\beta_2$. En esta línea, diversas investigaciones que han empleado técnicas genéticas para generar ratones mutantes, en donde faltan una o dos de las subunidades de los receptores nicotínicos, sugieren que las subunidades α_5 , α_3 y/o β_4 nAChRs regulan muchas actividades relacionadas con la adicción a la nicotina (Thorgeirsson y cols., 2010).

El uso de agonistas nAChRs puede representar una nueva terapia farmacológica y ofrecer una importante oportunidad para el tratamiento del tabaquismo (Navarrete y cols., 2013). La investigación en este ámbito continúa actualmente en múltiples direcciones y se están abriendo nuevas perspectivas en los estudios acerca de la farmacología de la nicotina. Los estudios se están centrando también en agentes (o sustancias) no nAChR como candidatos para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la dependencia del tabaco (Tonstad y Aubin, 2012). Recientemente, Navarrete y colaboradores (2013) empleando ratones que no tienen o en los que es bloqueado mediante fármacos el receptor cannabinoide CB2 observaron que presentaban una disminución del efecto reforzante y motivacional de la nicotina.

Una estrategia novedosa es la vacuna antinicotínica, con la que se intenta que el sistema inmune reconozca a la nicotina como un extraño y desarrolle una respuesta inmune contra la droga (Goniewitz y Delijewski, 2013). Al mismo tiempo, la tendencia creciente en los ensayos clínicos ha sido estudiar compuestos que no requieren aprobación de la “*Food and Drug Administration*” (FDA) para dejar de fumar, al clasificarse como complementos alimenticios, tales como la S-adenosil-L-metionina (SAMe) y la N-acetil-cisteína (NAC). Los estudios indican que la S-adenosil-L-metionina actúa incrementando los neurotransmisores monoaminérgicos especialmente cuando los niveles de dopamina son bajos, consiguiendo de esta forma atenuar los efectos negativos que se produce durante el síndrome de abstinencia y facilitando la abstinencia a largo plazo (Hugues y cols., 2014; Kagan y cols., 1990). En modelos preclínicos, la NAC normaliza la disminución de los niveles de glutamato basal en el núcleo accumbens, consiguiéndose una disminución en los comportamientos de búsqueda de la nicotina (Baker y cols., 2003). También se ha observado que produce una reducción en el número de cigarrillos consumidos por los fumadores (Knackstedt y cols., 2009).

Teniendo en cuenta el gran número de estrategias y tratamientos terapéuticos existentes para abordar el tabaquismo, cada vez más se recomienda que el tratamiento se realice de manera individualizada en función de cada paciente. Para ello se tiene que tener en cuenta las variables específicas del fumador, la combinación de tratamientos farmacológicos y psicológicos que pueden ejercer efectos inmediatos en los síntomas del síndrome de abstinencia, así como efectos de larga duración gracias al desarrollo de estrategias y habilidades cognitivas y comportamentales.

Puesto que la mayor parte de los fumadores adultos indican que empezaron a fumar en la adolescencia, actualmente se ha establecido como una prioridad de salud pública la implementación de programas para ayudar a abandonar el tabaquismo en la adolescencia. Sin embargo, aunque existe una amplia literatura sobre los múltiples tratamientos para dejar de fumar en los adultos, los estudios en adolescentes son escasos y contradictorios. En la revisión realizada por Bailey y colaboradores (2012) acerca de la eficacia y tolerabilidad de la farmacoterapia en la adolescencia se concluyó que el bupropión también puede ser efectivo en dicha población (Bailey y cols., 2012). En cambio, otros estudios no han podido confirmar este efecto beneficioso en población adolescente (Stanton y Grimshaw, 2013).

La adolescencia es una época de grandes transformaciones tanto en humanos como en animales. Los cambios en este periodo evolutivo se producen a nivel neural, hormonal, y psicosocial. La labilidad emocional, la impulsividad y la asunción de riesgos son características de la adolescencia humana y se asocian con una mayor vulnerabilidad a una variedad de trastornos neuropsiquiátricos y a la adicción (Andersen, 2003). Las características de comportamiento de la adolescencia se cree que reflejan la maduración incompleta de los sistemas neuronales de la regulación de las emociones y el control del comportamiento inhibitorio (Hariri y Holmes, 2006).

El tabaquismo puede ser considerado como un comportamiento de búsqueda del riesgo, que resulta ser especialmente perjudicial en un periodo evolutivo en el que el cerebro de los adolescentes sigue desarrollándose (Konrad y cols., 2013). De hecho, las conductas de asunción de riesgos conllevan una excitación fisiológica placentera inmediata que puede relacionarse con resultados indeseables, como es el consumo de sustancias o el comportamiento agresivo (Boyer, 2006). Diversas investigaciones han propuesto que una de las estructuras cerebrales más vinculadas a las conductas de búsqueda de riesgo es la corteza prefrontal (Steinberg, 2007), aunque las técnicas de neuroimagen aportan evidencia de que otras estructuras cerebrales también están implicadas en los comportamientos arriesgados del adolescente. Se sabe que en este periodo hay una mayor activación del circuito mesolímbico que se encuentra relacionado con el placer y la recompensa. Asimismo, la interrelación entre los mecanismos cerebrales de la recompensa y los encargados de la información emocional pueden llevar a los adolescentes a asumir más conductas de riesgo en presencia de iguales que cuando se encuentran solos (ver revisión de Smith y cols., 2015). Dentro de las conductas de asunción de riesgo se incluyen algunos comportamientos antisociales, relacionándolo de esta forma con la agresividad, la impulsividad y el autocontrol, por lo que se ha sugerido que pueden compartir la misma base neurológica, dependiendo de esta forma de circuitos cerebrales similares, los cuales como ya se ha dicho anteriormente experimentan importantes cambios durante la adolescencia.

En relación con la conducta agresiva, los estudios con técnicas de neuroimagen corroboran lo hallado en la investigación animal, de forma que el circuito de amenaza que comprende la amígdala, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal, se encuentran relacionados con la agresividad, activándose en situaciones de estrés o amenaza, bajo el control de la corteza cerebral. Por lo que, al igual que en la asunción de riesgos, la

agresividad puede verse incrementada tanto por la hiperexcitabilidad del sistema de amenaza, por un déficit en la regulación prefrontal, así como por los niveles hormonales propios de la adolescencia (Blair, 2004).

Dado que en el presente trabajo se han utilizado roedores como sujetos experimentales en modelos animales que evalúan los efectos cognitivos y emocionales del bupropión, a continuación, y previa a la exposición de los estudios experimentales llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral, se realizará una breve descripción de las investigaciones realizadas por otros autores y que aportan datos de interés para conocer los efectos conductuales del bupropión, así como su interacción con la nicotina.

3. ACCIONES CONDUCTUALES DEL BUPROPIÓN EN MODELOS ANIMALES

El desarrollo de modelos animales apropiados que permitan estudiar las bases biológicas de las enfermedades psiquiátricas facilita el hallazgo de nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, el estudio de los efectos del bupropión aplicando diferentes modelos animales constituye una fuente importante de información acerca del mecanismo de acción de dicho fármaco y sus posibilidades terapéuticas. Gran parte de la investigación ha empleado roedores, especialmente ratas, como sujetos experimentales, aunque en un estudio clásico realizado por Suckow y colaboradores (1986) ya describieron diferencias importantes en la acción de este antidepresivo entre ratas y ratones. Estos autores hallaron que, a diferencia de las ratas, los ratones metabolizaban el bupropión de forma similar a los humanos, lo que justifica el interés de utilizar ratones como sujetos experimentales para valorar los efectos fisiológicos y conductuales de este fármaco.

Por otra parte, las investigaciones sobre los efectos del bupropión, tanto en sujetos humanos como en roedores, han puesto de manifiesto la importancia de las diferencias individuales en el efecto de este antidepresivo (Duclot y Kabbaj, 2013). Actualmente está aceptado que la manifestación de diferentes trastornos mentales se relaciona con diferencias individuales que van a influir sobre la mayor o menor vulnerabilidad al desarrollo de los mismos. Por lo tanto, se espera que dichas diferencias individuales sean detectadas en los modelos animales que se emplean para evaluar la efectividad de un fármaco en las conductas que se asocian a una determinada enfermedad (Armario y Nadal, 2013).

3.1. Efectos del bupropión sobre la actividad motora

Con el objetivo de evaluar los cambios conductuales asociados al efecto del bupropión sobre la actividad motora se han empleado diversas técnicas. Los métodos más específicos son el actímetro y el test de campo abierto, pero también se han aplicado otros instrumentos que permiten valorar de forma indirecta los efectos psicomotores del bupropión, como la prueba de natación forzada y el test de suspensión de la cola (Cunha y cols., 2012).

Diversos trabajos han confirmado que tanto el tratamiento agudo como crónico con bupropión induce un incremento de la actividad motora en roedores de forma dosis dependiente (Redolat y cols., 2005). Este efecto locomotor se mantiene e incluso se intensifica con la administración repetida del fármaco (Nomikos y cols., 1992). En nuestro laboratorio empleando dosis elevadas e intermedias (20, 15 y 10 mg/kg) de bupropión pudimos observar en el actímetro que este fármaco incrementaba la actividad motora de los animales de diferentes edades (adultos, adolescentes y preadolescentes) (Redolat y cols., 2005). Tucka y colaboradores (2005) hallaron que dosis de 75 a 150 mg/kg provocaban en los ratones convulsiones clónicas de forma dosis-dependiente, induciendo deterioro motor. El incremento de la actividad motora está mediado por el sistema dopaminérgico, ya que la destrucción de neuronas dopaminérgicas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) impide la aparición de esta conducta (Cooper y cols., 1980).

Por otro lado, los estudios previos indican que la administración crónica de bupropión (durante 14 días) potencia la actividad locomotora de forma similar a la inducida por el tratamiento con anfetaminas (Klimek y cols., 1985). En esta línea, otras investigaciones han evaluado si sería posible condicionar la hiperactividad inducida por dicho fármaco al igual que ocurre con otras drogas psicoestimulantes, tales como anfetamina, cocaína o nicotina (Wilkinson, 2007). Los resultados obtenidos señalan que este condicionamiento es posible: el procedimiento que incluía asociar repetidamente el bupropión con señales ambientales demostró que estas claves ambientales en ausencia del fármaco producían un incremento en la actividad motora (Wilkinson, 2007).

La actividad motora en roedores también puede medirse de forma indirecta a través del test de natación forzada, test que fue desarrollado por Porsolt y colaboradores en 1977, y que se ha convertido en una prueba estándar para valorar los efectos antidepresivos en roedores. En este procedimiento los ratones o ratas son introducidos en un tanque con agua durante el

breve periodo que dura el test, teniendo en cuenta la actividad motora y cuantificando los periodos de inmovilidad (flotación). Los tratamientos con antidepresivos disminuyen el tiempo que el animal está inactivo o inmóvil en el tanque de agua. Hutchison y Weis (2005) encontraron que el tratamiento crónico (14 días) con bupropión disminuía la conducta de flotación de las ratas tanto en machos como en hembras. Otras investigaciones también confirman que las dosis altas y medias disminuyen la inmovilidad en el test de natación forzada y en el test de suspensión de la cola en ratones adultos (Cunha y cols., 2008). Este efecto anti-inmovilidad se ha asociado principalmente a los metabolitos activos del bupropión como el hidroxibupropión (Dwoskin y cols., 2006), y también a sus acciones sobre los receptores dopaminérgicos D1 y D2, ya que si se administra conjuntamente con un antagonista de los receptores D1 (SCH 23390) o D2 (sulpiride) se revierte su efecto (Yamada y cols., 2004).

Una parte de las investigaciones emplean como sujetos experimentales a roedores que previamente han sido manipulados genéticamente, lo que les hace más vulnerables a los tratamientos farmacológicos. En esta línea, Haenisch y colaboradores (2009) observaron que los ratones NETKO resistentes a las conductas de depresión respondían al tratamiento con bupropión disminuyendo significativamente el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada en comparación con los ratones tratados con salino. En ratas tratadas con la hormona adrenocorticotropina, que potencia la resistencia a la depresión, la administración de bupropión también causa una reducción de la inmovilidad en esta prueba conductual (Kitamura y cols., 2010).

En resumen, los resultados expuestos anteriormente muestran la acción motora del bupropión en roedores, lo que podría influir en la conducta mostrada por los roedores en otros modelos animales.

3.2. Efectos del bupropión sobre el aprendizaje y la memoria

Existe creciente interés en el desarrollo de fármacos que mejoren el aprendizaje y una gran parte de las investigaciones emplean modelos animales que evalúan memoria espacial asociada al hipocampo ya que esta es especialmente vulnerable a los efectos de la edad. Con este fin se aplican diferentes paradigmas como son el laberinto de agua, el laberinto en Y o

el radial (Sharma y cols., 2010). El aprendizaje también puede ser medido a través de tareas de condicionamiento (Portugal y Goulgd, 2007).

Existen pocos estudios en modelos animales que valoren los procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria tras la administración de bupropión. Se ha hipotetizado que el tratamiento con este fármaco produce efectos similares a la nicotina en las tareas de condicionamiento clásico y operante (Wilkinson y Bevins, 2009). Por ejemplo, estudios previos hallaron que el bupropión podía sustituir los efectos interoceptivos de la nicotina en tareas de condicionamiento operante (Wiley y cols., 2002) y en tareas de condicionamiento paulovianas (Bevins y cols., 2006). En un trabajo realizado por Portugal y Gould (2007) se mostró que los ratones tratados previamente con nicotina durante 12 días y en periodo de abstinencia de 24 horas, la administración de altas dosis de bupropión (20 y 40 mg/kg) producía un deterioro del aprendizaje de forma dosis dependiente en ambos tipos de condicionamientos. Sin embargo, la dosis baja de bupropión (5mg/kg) revertía el déficit en el condicionamiento contextual.

Otras investigaciones han encontrado que este fármaco mejora el rendimiento en otro tipo de tareas de aprendizaje (Rauhut y cols., 2008). Así, Kruk y colaboradores (2011), empleando el test del laberinto elevado en cruz para evaluar los procesos relacionados con la memoria, observaron que el tratamiento agudo de bupropión (10 o 20 mg/kg) previo a la administración de una inyección de nicotina atenúa tanto el efecto amnésico de la escopolamina, como el antiamnésico inducido por la nicotina. En otros modelos animales también se ha constatado que el bupropión produce cambios en la capacidad de aprendizaje de las ratas. Por ejemplo, induce preferencia de lugar (Ortmann, 1985), interrumpe la respuesta de latencia inhibitoria de forma dosis-dependiente medida en el test de condicionamiento emocional (Lipina y Roder, 2010) y mejora la recuperación de la prueba de evitación inhibitoria, la cual se considera un buen modelo para evaluar la memoria con alto contenido emocional (Barros y cols., 2002). El fármaco también revierte el deterioro inducido por reserpina en el test de evitación condicionada cuando se administra a dosis de 40 mg/kg (Nakawa y cols., 1997).

Recientes estudios realizados por Kale y Addepalli (2015) empleando el laberinto elevado y el laberinto de agua han hallado que el bupropión solo o combinado con duloxetina mejora las funciones cognitivas en ratones.

3.3. Efectos del bupropión sobre la ansiedad, la conducta exploratoria y la búsqueda de novedad

En la investigación experimental se han aplicado una amplia diversidad de modelos animales para testar los agentes ansiolíticos y estudiar su mecanismo de acción. Los test utilizados con roedores para evaluar la conducta exploratoria pueden estar modulados por diversos factores como la exploración voluntaria del animal de estímulos nuevos o el temor ante la exposición al aparato. Además, hay que tener en cuenta los efectos específicos del tratamiento farmacológico que se aplique y su posible influencia sobre la actividad motora mostrada por el animal (Kliethermes y cols., 2006). Una de las pruebas más utilizadas para evaluar la ansiedad es el laberinto elevado en forma de cruz o *plus maze* y para la búsqueda de novedad la tabla de agujeros o *hole board*.

Los hallazgos obtenidos en investigaciones previas sobre los efectos del bupropión en la ansiedad utilizando el laberinto elevado en forma de cruz, cuando el fármaco se administra a ratones en la edad adulta han sido contradictorios: se ha observado un perfil ansiogénico (Comissaris y cols., 1990), un efecto ansiolítico (Biala y Kruk, 2009); o bien el fármaco no ha mostrado ningún efecto sobre la ansiedad (Redolat y cols., 2005). Por otro lado, la administración diaria de dosis bajas de bupropión (2 o 5 mg/kg) disminuye la ansiedad inducida por la abstinencia del triazolam (Joshi y cols., 2005) y contrarresta los efectos ansiógenos inducidos por la nicotina o la D-anfetamina (Biala y Kruk, 2009). Además, tanto el bupropión como sus metabolitos atenúan los efectos desagradables provocados por la ansiedad derivada del síndrome de abstinencia de nicotina en ratones (Damaj y cols., 2010).

Estudios previos con diferentes dosis de bupropión han encontrado que dosis inferiores a 20 mg/kg de bupropión en ratones no inducen efectos claros en la prueba de laberinto elevado en forma de cruz (Carrasco y cols., 2004) y en el test de interacción social (Dwoskin y cols., 2006). Por el contrario, dosis superiores a 40 mg/kg incrementan el número de entradas en los brazos abiertos, así como la actividad locomotora (Carrasco y cols., 2004). La administración de dosis elevadas de bupropión también disminuye el número de veces en que los ratones asoman la cabeza en el *hole board* e incrementan la duración del ataque en

un modelo de agresión inducido por aislamiento en animales que muestran elevada agresividad (Redolat y cols., 2005). Estas observaciones podrían sugerir una acción ansiolítica del bupropión, junto con cierta acción como estimulante psicomotor (Redolat y cols., 2005), aunque sus efectos sobre el nivel de ansiedad pueden estar modulados por la edad a la que se administra el fármaco. En este sentido, un reciente estudio realizado en nuestro laboratorio señala que el efecto del bupropión sobre el nivel de ansiedad es dependiente de la edad en ratones, mostrando los adolescentes un perfil ansiogénico (Carrasco y cols., 2013).

3.4. Efectos del bupropión sobre la conducta de interacción social

Los efectos del bupropión sobre la conducta social y agresiva de los roedores han sido en general poco evaluados. Algunas investigaciones ponen especial interés en la ansiedad, la irritabilidad y el incremento de la agresión, que son algunos de los síntomas que aparecen durante la abstinencia a la nicotina (Ward y cols., 2001).

Estudios pioneros indican que la administración de agonistas de la dopamina, en general, inducen un incremento de los patrones de ofensa en la conducta agonística, y que los antagonistas de la dopamina inhibirían la agresión (Poshivalov, 1986). Por ello, se espera que la administración de bupropión, al aumentar los niveles de neurotransmisión dopaminérgica, podría tener un efecto proagresivo. Sin embargo, las acciones del bupropión sobre la agresión resultan complejas y difíciles de interpretar, puesto que la conducta agresiva está en interacción con muchas otras conductas mostradas por el animal durante los encuentros agonísticos (Blanchard y cols., 2003).

Como señalan Nelson y Trainor (2007) la conducta agresiva no es un proceso unitario, sino que responde a complejas interacciones fisiológicas, motivacionales y factores comportamentales complejos. Generalmente el método que se emplea para inducir la agresión en roedores consiste en alojarlos de forma aislada (Miczek y cols., 2002), debido a que cuando se encuentran agrupados muestran bajos niveles de agresividad (Estelles y cols., 2004). Estudios previos en nuestro laboratorio han encontrado que el bupropión tiene efectos en la ansiedad, sin que se puedan asociar directamente al tipo de alojamiento (Redolat y cols., 2005). En este estudio, se halló que el incremento de la conducta ofensiva solo

resultaba significativo en los ratones que mostraban un bajo nivel de agresividad, por lo que no tenían una clara correlación con las dosis administradas sino con el nivel basal de irritabilidad de los ratones (Redolat y cols., 2005).

Por otra parte, los efectos de la nicotina sobre la conducta agresiva son escasos y no existe un perfil conductual claramente definido. Redolat y colaboradores (2000) no hallaron una reducción del tiempo dedicado a la amenaza y al ataque tras la administración aguda o crónica de dicho fármaco durante 10 días. En cambio, Johnson y colaboradores (2003) encontraron que la nicotina disminuyó la conducta de ofensa y defensa en agresión, si bien el efecto era más potente en el último caso. Las diferencias en los resultados obtenidos pueden ser explicados por los diferentes paradigmas y las dosis que se emplearon en cada uno de los estudios.

4. EFECTOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE BUPROPIÓN Y NICOTINA

El trabajo realizado con modelos animales acerca de las bases conductuales, cognitivas y neurobiológicas en la dependencia de la nicotina ha contribuido notablemente a esclarecer la participación de los diferentes mecanismos de refuerzo que subyacen al consumo de nicotina y de sus posibles tratamientos (Markou y Paterson, 2009).

Una fructífera línea de investigación se ha centrado en los efectos del bupropión en la auto-administración (AA) de nicotina. Algunos estudios indican que el tratamiento agudo de dicho fármaco disminuye la AA de nicotina. Por ejemplo, Glick y colaboradores (2002) encontraron que la administración de 30 mg/kg de bupropión disminuyó selectivamente la AA de nicotina (infusión de 30 mg/kg) sin afectar a otras respuestas (ingestión de agua) en ratas hembras Long-Evans. Aumentando la dosis a 40 mg/kg de bupropión, otros autores consiguieron una disminución de la auto-administración de una infusión de 30 mg/kg de nicotina en ratas Wistar macho (Bruijnzeel y Markou, 2003) o en ratas Sprague-Dawley (Liu y cols., 2008). Igualmente, algunos estudios han evaluado los efectos de la administración crónica del bupropión en la AA de nicotina. Shoaib y colaboradores (2003) informaron que la administración diaria repetida de 30 mg/kg de bupropión aumentaba la AA de una dosis alta de nicotina (infusión de 90 mg/kg), pero no tuvo efecto en la auto-administración de una infusión de 30 mg/kg de nicotina en ratas Hooded Lister macho. En resumen, los estudios

de AA ofrecen resultados contradictorios, ya que indican que la administración aguda y crónica de bupropión puede aumentar, disminuir, o no tener ningún efecto sobre la conducta de autoadministración de nicotina. Pueden haber contribuido a estos resultados inconsistentes las diferencias en las dosis unitarias de nicotina autoadministradas o el uso de diferentes cepas de ratas.

Por otra parte, la interacción de ambos fármacos (nicotina y bupropión) se ha examinado en el modelo de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL). En este paradigma conductual las propiedades motivacionales primarias de un estímulo (la nicotina) se utilizan como estímulo incondicionado (EI). El emparejamiento repetido del EI con un conjunto de claves ambientales inicialmente neutras hace que estas adquieran propiedades motivacionales secundarias que pueden actuar como estímulo condicionado (EC). Cuando el animal es expuesto nuevamente al lugar donde se le administró la nicotina en función de las propiedades motivacionales del tratamiento con bupropión puede provocar cambios en las propiedades reforzantes de la nicotina (Pérez de los Cobos., 2006). Otro modelo ampliamente utilizado es la discriminación de estímulos, que consiste básicamente en administrar un determinado fármaco (nicotina) y enseñarle al animal a obtener sacarosa presionando una de las dos palancas disponibles y cuando se le administra un placebo enseñarle a presionar la otra palanca: si se le administra otra droga (bupropión) y el animal presiona la palanca de la nicotina podemos concluir que ambas sustancias tienen características parecidas (Pérez de los Cobos., 2006). Aplicando ambos modelos los resultados indican que el bupropión puede ayudar a superar la abstinencia nicotínica, en parte porque mimetiza los efectos subjetivos de la nicotina y mejora las propiedades motivacionales en ausencia de dicha sustancia psicoactiva (Paterson y cols., 2008). La mejora producida por el bupropión en las propiedades motivacionales parece ser debida a la inhibición de la recaptación de dopamina, aunque también podría deberse a una similitud en los efectos subjetivos proporcionados por ambos fármacos, asociando estos efectos beneficiosos al aumento de los niveles de dopamina (Grabus y cols., 2012).

La amplia investigación con modelos preclínicos en este campo ha facilitado un mayor conocimiento de las diferencias neurobiológicas del bupropión y la nicotina y sus acciones farmacológicas contribuyendo a combatir mejor el craving en sujetos que desean dejar de fumar. No obstante, el tratamiento con bupropión y/o nicotina muestra resultados controvertidos en patrones conductuales tan complejos. Por ello, determinar si existen

diferencias en los efectos de la nicotina, el bupropión o su interacción sobre el aprendizaje, la ansiedad y la agresividad (en los animales adolescentes y adultos) puede ser relevante en la comprensión de las propiedades farmacológicas y conductuales de estas sustancias.

II.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El propósito general de la presente Tesis Doctoral fue establecer el perfil conductual del bupropión aplicando diferentes modelos animales con el fin de conocer mejor el mecanismo de acción de este fármaco, especialmente cuando se utiliza como tratamiento para ayudar a dejar de fumar. Para ello se han evaluado los cambios conductuales inducidos por el fármaco, tanto administrado solo como en combinación con nicotina, en ratones NMRI aplicando diferentes paradigmas conductuales que evalúan aprendizaje y memoria, ansiedad, conducta exploratoria y búsqueda de novedad e interacción social. Hay que tener en cuenta, además, la complejidad de acciones de este fármaco a nivel neuroquímico y las diferencias individuales en respuesta al mismo ya que factores como la edad de los animales o el tipo de alojamiento en el que se mantienen durante los experimentos podrían modular sus efectos conductuales.

A pesar de la amplia utilización del bupropión, tanto en el tratamiento de la adicción al tabaco como en el tratamiento de la depresión y el trastorno bipolar, y de su indudable interés clínico y experimental, existían muy pocos trabajos en los que se abordase el estudio sistemático de las acciones de este fármaco a nivel conductual. Estos estudios pueden resultar de interés en la búsqueda de mejores tratamientos y para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción del fármaco.

Teniendo en cuenta los trabajos previos y el propósito general de la presente Tesis Doctoral, los **objetivos** concretos que nos planteamos fueron:

1. Valorar los cambios a nivel conductual inducidos por la administración de bupropión en tareas de aprendizaje y memoria. El aprendizaje implícito se evaluó utilizando la tarea de condicionamiento de evitación activa que permite analizar los efectos sobre la adquisición y la retención, además de tener en cuenta otros parámetros conductuales que reflejan indirectamente alteraciones en la actividad motora. También se investigaran los cambios a nivel de aprendizaje espacial aplicando para ello una tarea ampliamente utilizada en la literatura como es el laberinto de agua de Morris.
2. Evaluar los efectos de la administración de diferentes dosis de bupropión, solo o co-administrado con nicotina, sobre la conducta de exploración y de búsqueda de novedad utilizando la tarea de la tabla de agujeros o “*hole-board*”. Además dado que la adolescencia se caracteriza por niveles más elevados de búsqueda de novedad se consideró de interés comparar los efectos del fármaco en ratones de diferentes edades.

3. Describir el perfil conductual del bupropión, solo o co-administrado con nicotina, en un modelo animal clásico de ansiedad como es el “*plus-maze*” o laberinto elevado en forma de cruz. En este test se tuvieron en cuenta tanto las medidas clásicas como parámetros etológicos que permiten discriminar los efectos ansiolíticos y/o ansiógenos de los fármacos.
4. Establecer los efectos del bupropión en conductas de interacción social. Para ello se realizaron dos experimentos evaluando tanto el perfil conductual del bupropión como la interacción de este fármaco con diferentes dosis de nicotina en ratones aislados. Además, debido a que la investigación reciente ha puesto de manifiesto la relevancia de las condiciones de alojamiento de los animales, en el último experimento se realizó un diseño complejo en el que diferentes grupos de animales fueron mantenidos en idénticas condiciones (aislamiento vs alojamiento en grupo) a lo largo de todo el experimento o bien fueron expuestos a cambios en su condición de alojamiento.

En relación con dichos objetivos y teniendo en cuenta los estudios revisados que se han descrito de forma detallada en el marco teórico de la presente Tesis, se establecen las siguientes **hipótesis**:

1.- Los efectos del bupropión sobre las tareas de aprendizaje y memoria han sido en general poco evaluados en investigaciones previas y todavía no se conocen totalmente. Se ha sugerido que el tratamiento con bupropión puede mejorar los procesos de memoria en ratones abstinentes de nicotina (Biala y cols., 2009), aunque también este fármaco puede deteriorar el aprendizaje de forma dosis-dependiente (Portugal y Gould, 2007). Además, se ha observado que el bupropión produce efectos similares a la nicotina en el condicionamiento clásico y en tareas de discriminación operante (Young y Glennon, 2002; Wilkinson y cols., 2009). Los efectos de este fármaco en tareas de evitación activa no han sido previamente estudiados pero se ha informado de que puede mejorar la ejecución en tareas de evitación inhibitoria (Barros y cols., 2002). Recientemente, también se ha informado de que dosis bajas de bupropión pueden mejorar la adquisición del laberinto de agua (Kale y Addepalli, 2015).

La edad en la que se administra el bupropión es uno de los factores que pueden influir sobre los efectos conductuales inducidos por el fármaco (Carrasco y cols., 2013).

Es conocido que durante la adolescencia se producen cambios tanto en el funcionamiento de diferentes sistemas de neurotransmisión como en la respuesta a los fármacos (Logue y Gould, 2014). La ejecución de los animales en tareas de aprendizaje espacial como el laberinto de agua puede también estar influida por la edad de los animales (Sharma y cols., 2010), por lo que en este paradigma conductual resulta de interés comparar los efectos del fármaco a diferentes edades.

De acuerdo con la literatura revisada, en el presente trabajo hipotetizamos que el tratamiento con bupropión mejorará la ejecución en tareas de aprendizaje y memoria. En la tarea de evitación activa es esperable que dicha mejora se refleje en el número de evitaciones, aunque debido a los efectos motores del bupropión hay que considerar también los cambios inducidos por el fármaco en otras variables como número de cruces entre ensayos o durante el periodo de adaptación al test. En el laberinto de agua la hiperactividad inducida por el bupropión puede interferir con la adquisición de la tarea, especialmente en los ratones adolescentes, por lo que se espera que la mejora sea más evidente en adultos.

2.- Diversos estudios se han centrado en determinar si existen diferencias en la conducta de búsqueda de la novedad entre animales adolescentes y adultos, empleando diferentes tests conductuales (Hefner y Holmes, 2007). Los resultados hallados hasta el momento sugieren que los adolescentes son más impulsivos y muestran una mayor búsqueda del riesgo (Steinberg, 2007).

La exploración de agujeros en el *hole board* ha sido propuesto como un índice de conducta exploratoria (File y Warding, 1975) y búsqueda de novedad (Aydin y cols., 2012). Además, se ha sugerido que un menor número de “*head dipping*” en este test reflejaría mayor ansiedad (Bali y Jaggi, 2015). En un estudio previo hemos observado que el bupropión reduce la búsqueda de la novedad empleando la tabla de agujeros (Carrasco y cols., 2013). Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio también indican que el bupropión induce hiperactividad tanto en ratones adolescentes como adultos (Redolat y cols., 2005). En relación con la nicotina los resultados son contradictorios: aunque en general este fármaco disminuye la actividad motora y exploratoria en algunos estudios incrementaba o no modificaba la tasa de *head dipping* (Marco y cols., 2005). En ratones adolescentes recientemente Abreu-Villaca y colaboradores (2015) han mostrado que la nicotina disminuye la búsqueda de novedad en ratones adolescentes, especialmente

cuando se administra a dosis bajas. Hay que tener en cuenta que las diferencias individuales en la sensibilidad a la nicotina en modelos animales dependen de factores como actividad basal de los animales experimentales, respuesta a la novedad o nivel de impulsividad (Redolat y cols., 2009).

Aunque existe escasa información acerca los efectos del bupropión sobre la conducta de búsqueda de novedad hipotetizamos que el tratamiento con bupropión disminuirá la conducta exploratoria en los ratones adolescentes puesto que éstos serán más sensibles a los efectos conductuales del fármaco. También esperamos que la co-administración con nicotina module la conducta de exploración. Se sugiere que la administración conjunta de ambos fármacos podría potenciar el efecto del bupropión sobre la conducta exploratoria. Estos cambios podrán observarse de modo más detallado en la evaluación etofarmacológica que tiene en cuenta no solo la conducta de *head dipping* sino todo el repertorio conductual mostrado por el animal durante la prueba.

3.- Los posibles efectos ansiolíticos/ansiógenos del bupropión han sido evaluados en diferentes modelos animales, aunque los mecanismos de acción mediante los cuales el fármaco ejerce sus efectos todavía no son bien conocidos (Vázquez-Gómez, 2014). Investigaciones previas acerca de los efectos del bupropión sobre el nivel de ansiedad mostrado por los animales en el laberinto elevado han obtenido resultados contradictorios. Cuando se administra en la edad adulta, este fármaco ha demostrado tener un perfil ansiogénico (Redolat y cols., 2005; Carrasco y cols., 2013), ansiolítico (Biala y Kruk, 2009), o ningún efecto en las conductas evaluadas en el *plus-maze* (Carrasco y cols., 2004; Redolat y cols., 2005). También el tratamiento con nicotina proporciona resultados contradictorios observándose que puede actuar como ansiolítico, ansiógeno, o no tener efectos en diferentes pruebas de ansiedad (Varani y Balerio, 2012; Zarrindast y cols., 2013). En el laberinto elevado se observan efectos ansiógenos dependiendo de las dosis administradas (Zarrindast y cols. 2010; Carrasco y cols., 2013). Además, diversos estudios informan de diferencias en la sensibilidad entre ratones adolescentes y adultos en los efectos de tanto del bupropión (Carrasco y cols., 2013) como de la nicotina (Muhammad y cols., 2014), siendo en general los adolescentes más sensibles a los efectos de estos fármacos.

A pesar de que es conocido que las drogas de abuso como la nicotina pueden modular la expresión de la ansiedad en diferentes modelos animales se han publicado

pocos trabajos acerca de los efectos de la combinación de bupropión con nicotina en tareas de ansiedad. Un estudio previo encontró que el tratamiento con dosis bajas de bupropión puede atenuar el efecto ansiógeno inducido por la nicotina (Biala y Kruk, 2009).

Teniendo en cuenta los datos publicados es plausible hipotetizar que el bupropión puede modular los cambios adaptativos mostrados por los animales en tareas de ansiedad como el laberinto elevado. La dirección de estos cambios resulta difícil de predecir ya que los estudios previos son contradictorios pero es esperable que estos efectos sean más evidentes en adolescentes. Cuando el bupropión es administrado conjuntamente con nicotina se puede esperar que los efectos del fármaco sobre el nivel de ansiedad dependan de la dosis de nicotina administrada.

4.- El bupropión muestra un amplio espectro de cambios conductuales. Se han descrito cambios emocionales inducidos por el bupropión en interacciones sociales en ratones (Vázquez-Gómez, 2014). Estudios previos de nuestro grupo de investigación describieron alteraciones en la conducta agresiva en respuesta al tratamiento con bupropión, observándose que este fármaco induce un incremento de la conducta ofensiva pero únicamente en los animales que mostraban un bajo nivel basal de agresividad. Además, la modalidad de alojamiento previa a la conducta agonística parece ejercer un papel modulador, de modo que el aislamiento social en ratones se emplea para inducir agresión (Burke y Miczeck, 2015) mientras que cuando los animales permanecen agrupados tienden a mostrar bajos niveles de agresividad (Estelles y cols. 2004).

Basándonos en lo expuesto, hipotetizamos que la administración de bupropión podría tener efectos diferenciales según el tipo de alojamiento y la edad de los animales esperándose que incremente la conducta agresiva especialmente con dosis elevadas y en animales que muestran bajos niveles de agresividad. Además, se espera que estos posibles efectos proagresivos del bupropión sean modulados por su coadministración de nicotina.

III.- PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIO 1

INFLUENCIA DEL BUPROPIÓN

EN TAREAS DE APRENDIZAJE

Y MEMORIA

El bupropión además de su eficacia terapéutica como antidepresivo o para ayudar a dejar de fumar, también puede tener efectos directos a nivel cognitivo. Se ha sugerido que los efectos de bupropión como antagonista nicotínico y sus acciones sobre la liberación de dopamina pueden estar relacionados con tareas de aprendizaje y memoria (Neumeister y Riepe, 2012). Las drogas que afectan a la transmisión en las sinapsis que liberan acetilcolina pueden impedir o facilitar el aprendizaje dependiendo del momento de administración de las mismas. Fármacos como la escopolamina o mecamilamina que suprimen la actividad colinérgica provocan un deterioro en la ejecución en el laberinto de agua. En cambio, los resultados que se obtienen tras la administración de agonistas colinérgicos como la nicotina dependen de diferentes factores incluyendo la especie, la dosis, el régimen de administración y la duración del tratamiento (Rauhut y col., 2005).

Otros estudios han destacado la importancia de las alteraciones del sistema dopaminérgico sobre la memoria (Thierry cols., 2000). En este sentido, trabajos llevados a cabo en ratones acerca de los principales efectos inducidos por déficits dopaminérgicos, encontraron que la adquisición del laberinto de agua era más lenta en los animales experimentales (Denenberg y cols., 2004). Asimismo, también se ha observado que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 interfiere en la realización de pruebas de memoria espacial en ratas (Seamans y cols., 1998). Otros autores, sin embargo, encuentran que el tratamiento con bupropión no mejora el aprendizaje espacial (Neumeister y Riepe, 2012).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se planteó como objetivo específico el estudio de los posibles efectos del bupropión en los procesos de aprendizaje y memoria. Con este propósito se realizaron dos experimentos en los que se valoraron los efectos del bupropión sobre la memoria implícita y explícita, mediante una prueba de aprendizaje de condicionamiento como el test de evitación activa en dos sentidos (Experimento 1) y una tarea espacial como el laberinto de agua de Morris (Experimento 2).

En el test de evitación activa el animal asocia que un tono (estímulo condicionado) predice la inminente llegada de una descarga eléctrica moderada en sus patas (estímulo incondicionado) y también aprende que puede evitar esa descarga si al oír el tono salta inmediatamente al otro lado de la jaula, produciéndose de este modo un condicionamiento

instrumental cuya adquisición y expresión es altamente dependiente de la amígdala. En dicho test el aprendizaje en condiciones aversivas desempeña un papel importante, puesto que el shock en los pies es un estresor físico que influye en la memoria emocional (Bali y Jaggi, 2013).

El laberinto de agua fue diseñado por Morris en el año 1984 (Morris, 1984) y es un modelo animal que permite evaluar el aprendizaje relacional y la memoria espacial. Al ser un laberinto de adquisición rápida se pueden estudiar los efectos de diferentes fármacos sobre los procesos de aprendizaje y memoria mejor que en otros laberintos de adquisición lenta (Hodges, 1996). En dicho paradigma se valora principalmente el tiempo de latencia que emplea el animal en alcanzar la plataforma sumergida, lo que representa un estímulo reforzante para el animal y su adquisición se relaciona con un buen funcionamiento del sistema hipocampal. La correcta adquisición de la tarea requiere que los animales naden desde la posición de salida hasta donde se encuentra la plataforma oculta, por lo que los animales deben recordar la localización de la plataforma utilizando las claves extralaberinto.

Números estudios realizados tanto en sujetos humanos como en roedores sugieren que la ansiedad y la memoria se encuentran relacionadas, pudiendo utilizar sistemas neuronales comunes (Jiao y cols., 2014). Asimismo, Gualtieri y Johnson (2007) hallaron una mejoría en el rendimiento cognitivo en pacientes deprimidos tras el tratamiento con bupropión. Por ello, cuando se valora el efecto de un fármaco hay que tener en cuenta la relación entre memoria y emocionalidad (Beuzen y Belzung, 1995). Además debemos recordar que tanto en el modelo de aprendizaje de condicionamiento de evitación activa como en el laberinto de agua los animales se encuentran expuestos a una situación altamente emocional que les resulta aversiva, de modo que en la tarea de evitación activa los animales evitan el lugar donde han recibido un shock eléctrico en las patas y en el laberinto de agua deben aprender a escapar del agua subiéndose a una plataforma

Las variaciones debidas a la edad y el estrés experimentado durante la adolescencia pueden contribuir a diversas alteraciones en el desarrollo cognitivo (Tsoory y cols., 2007). En una investigación con ratas adolescentes sometidas a un estrés físico continuado se observó que cuando estos animales fueron evaluados en la adultez se produjo un deterioro cognitivo medido a través del laberinto de agua. El deterioro observado en este modelo en animales expuestos a un estresor físico variable durante la

adolescencia correlaciona con la inhibición del crecimiento de células piramidales en CA1 en el giro dentado del hipocampo (Isgor y cols., 2004). Otras investigaciones, empleando ratas adolescentes, encontraron que únicamente tres días de exposición a estrés agudo eran suficientes para inducir deterioro en el rendimiento mostrado en la edad adulta en el test del condicionamiento de evitación activa (Avital y cols., 2006).

EXPERIMENTO 1. EFECTOS DEL BUPROPIÓN SOBRE EL CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA ¹

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. Animales

En este experimento se utilizaron 62 ratones machos de la cepa NMRI, obtenidos comercialmente de Charles-River (Barcelona, España), con un peso aproximado a la llegada al laboratorio de 30-32 gr. La elección de esta cepa se realizó teniendo en cuenta estudios previos en los que se ha demostrado que estos animales presentan buena capacidad para el aprendizaje (Moragrega y cols., 2005; Vicens y cols., 2003). Los animales fueron alojados en grupos de cinco, en cajas de plástico opaco (25x25x15 cm) mantenidos en condiciones estandarizadas de laboratorio, con ciclo de luz/oscuridad invertido (fase de oscuridad 7:30 a 19:30 h; fase de luz de 19:30 a 7:30 h) a una temperatura constante de 21° C. Los animales tuvieron disponible agua y comida *ad libitum*. A lo largo de todo el procedimiento se siguieron las normas nacionales e internacionales de cuidado y mantenimiento de los animales (Consejo Directivo de la Comunidad Europea de 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE). Real Decreto 53/2013, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos).

1.2. Aparatos

- Balanza digital (COBOS, D-600) para pesar a los animales a la llegada al laboratorio y durante el experimento.
- Balanza digital analítica (METTLER, AJ 150) utilizada para pesar el fármaco.
- Agitador magnético (AGIMATIC-N, P. SELECTA) para disolver el fármaco en el suero fisiológico.
- Caja de escape-evitación o *shuttle-box*. Dicha caja era de plástico opaco (45x21x30 cm) en la parte frontal había una ventana de plástico transparente. La caja estaba dividida en dos partes iguales de 24,5 cm, en la parte central había un separador con una puerta a través de la cual el animal tenía acceso a ambos compartimentos. Cuatro sensores invisibles de infrarrojos a cada lado de la caja (8 en total) registraban la localización del

¹ Los resultados hallados en este estudio están pendientes de evaluación en una revista JCR.

animal en cada momento. Cada cruce del animal se detectaba y grababa con el ordenador y el interfaz (Shuttle Scan; Omnitech Electronics, Columbus, Ohio). En el techo de cada compartimento había una bombilla de luz blanca (6w), que constituía el estímulo condicionado para que el animal cambiase de lado y evitase la descarga. El suelo de la caja estaba compuesto de 20 varillas de acero inoxidable, a través de las cuales se transmitía la descarga eléctrica al animal.

- Material de laboratorio: jeringuillas, agujas, guantes, botes esterilizados para el fármaco.

1.3. Fármaco

El fármaco utilizado fue bupropión (Bupropion Hydrochloride) obtenido comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España), que se disolvió en suero fisiológico para obtener la concentración deseada para cada dosis. Se utilizaron 3 dosis: 10, 20 y 40 mg/kg de bupropión. Dichas dosis fueron elegidas en base a estudios previos que mostraban sus efectos conductuales en ratones NMRI (Redolat y cols., 2005).

1.4. Procedimiento

El periodo de adaptación de los animales desde su llegada al laboratorio hasta la realización del experimento fue de 10 días. Los 62 animales experimentales se asignaron aleatoriamente a los 4 grupos de tratamiento (n=12). Cada uno de los grupos recibió una inyección intraperitoneal (IP) con bupropión o suero fisiológico durante cuatro días. El quinto día se modificó el tratamiento según el esquema de la Figura 1.1, con el fin de realizar una valoración más ajustada a los cambios en la curva de aprendizaje que podían resultar del efecto del fármaco en la memoria.

Los animales recibieron cinco sesiones de entrenamiento a lo largo de cinco días. Cada sesión consistía en 30 ensayos separados por un intervalo fijo entre ensayo (ITI) de 30 segundos. El estímulo incondicionado (EI) fue un shock eléctrico (de 0,28 mA de intensidad) y el estímulo condicionado (EC) una luz blanca de (6W). Cada animal era colocado en la parte izquierda de la caja y tras tres minutos de adaptación se iniciaba el test. El EC aparecía 10 segundos antes de que empezara el shock. El animal podía permanecer en el mismo lado y recibir los 10 seg de shock o al aparecer la luz cambiar al otro lado de la caja interrumpiendo de este modo el shock.

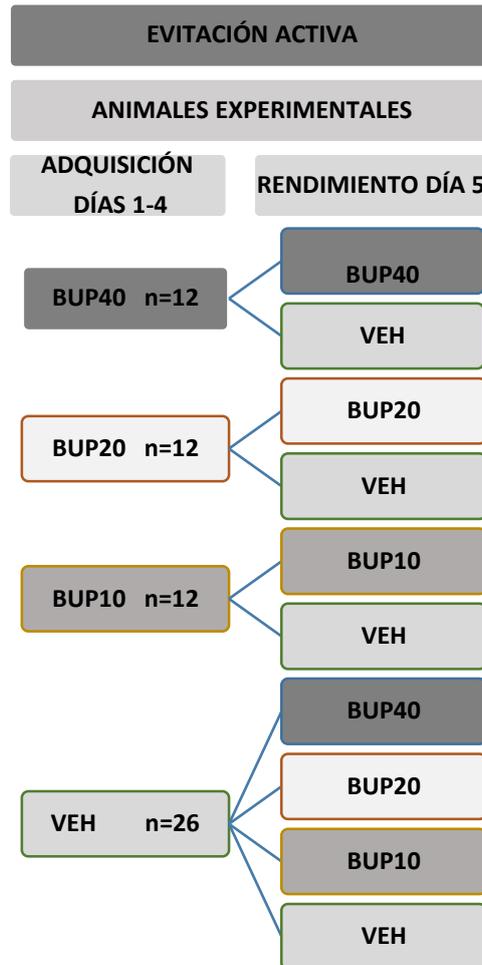


Figura 1.1. Esquema del procedimiento y el tratamiento utilizado.

En este test se registraron las siguientes conductas:

-**Respuesta de evitación** cuando el animal cruza al presentarse la luz (EC), antes de la aparición del EI (*shock*)

-**Respuesta de escape** cuando el animal cruza una vez iniciada la descarga eléctrica.

-**No respuesta** si el animal no cruza, ni durante el EC ni durante el EI.

-**Latencia de respuesta** es el tiempo que el animal tarda en realizar una respuesta tanto de evitación como de escape.

-**Número de cruces** realizados en el período de adaptación y los cruces en los intervalos entre ensayos se consideraron como un índice de la actividad de los animales.

2. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar las posibles diferencias entre los grupos en la adquisición de la tarea de condicionamiento de evitación activa se realizaron ANOVAS de medidas repetidas tomando como factor entre-sujeto la variable Tratamiento y el factor Día como variable intra-sujeto. En cada sesión se analizaron las siguientes variables: número de evitaciones, escapes y no respuestas; latencia de respuesta y número de cruces en el período de adaptación.

Para los análisis post-hoc se aplicaron las comparaciones DHS de Tukey. La probabilidad estadística considerada significativa fue $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. Fase de adquisición (1 a 4 días):

Evitaciones

El ANOVAS mostró que el bupropión influyó significativamente en el número de evitaciones $F(3,56) = 4,27$, $p < 0.009$. El análisis post-hoc DHS de Tukey indicó que los grupos tratados con BUP10 y BUP20 realizaron más evitaciones que el grupo control ($p < 0.05$ y $p < 0.035$, respectivamente). El factor Día resultó estadísticamente significativo $F(3,168) = 235.06$, $p < 0.001$, evidenciando que a medida que transcurrían los días los ratones realizaban más evitaciones.

La interacción Día x Tratamiento $F(9,168) = 3.79$, $p < 0.001$ también fue significativa. Los ANOVAS realizados de forma independiente para cada día indicaron que el factor Tratamiento resultó significativo en el día 1 $F(3,56) = 8.52$, $p < 0.001$, día 2 $F(3,56) = 2.90$, $p < 0.05$, y día 4 $F(3,56) = 4.63$, $p < 0.01$ (ver figura 1.2). En el día 1 los ratones tratados con BUP10 mostraron un mayor número de evitaciones que los que recibieron BUP40 o suero fisiológico ($p < 0.05$). En el día 2, las comparaciones entre los grupos no resultaron estadísticamente significativas. Se hallaron diferencias significativas entre el bupropión y el grupo control en el día 4, de modo que los ratones tratados con las dosis de BUP10 y de BUP20 realizaron un mayor número de evitaciones que los tratados con suero fisiológico ($p < 0.05$). No resultaron estadísticamente significativas las diferencias en el post-hoc del día 2.

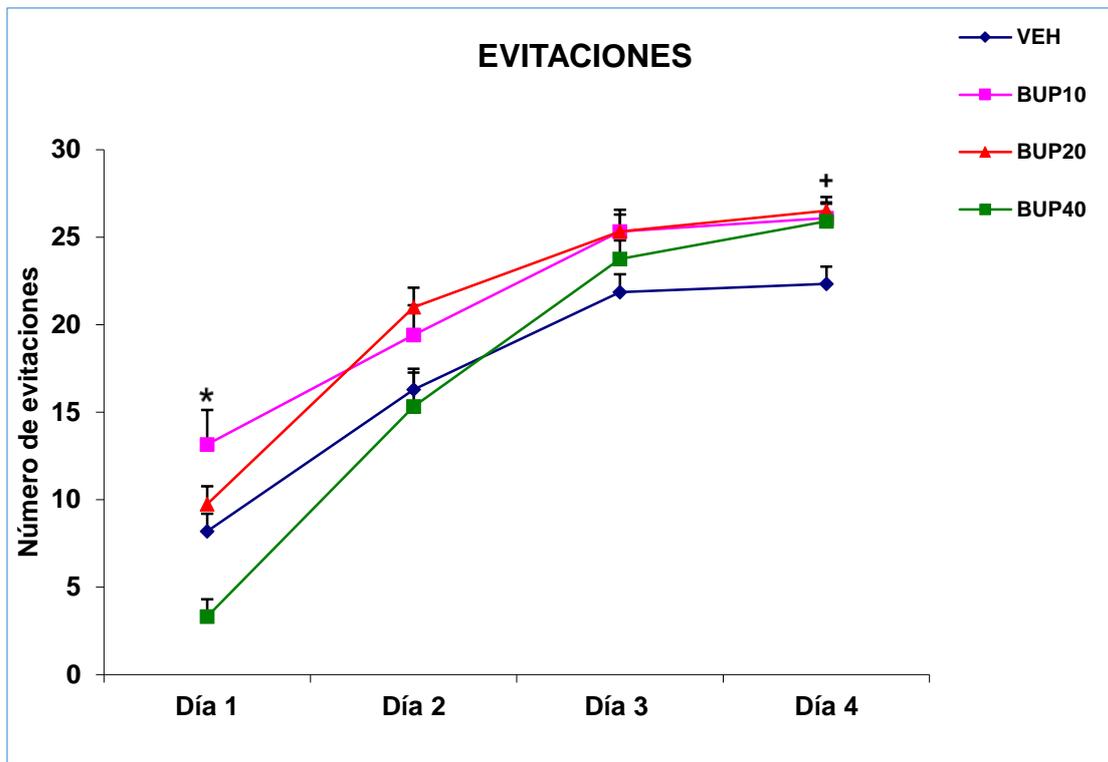


Figura 1.2: Media de la conducta de evitación (\pm SEM) de los diferentes grupos tratados con las dosis (40, 20, 10 mg/kg) de bupropión y vehículo durante los 4 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa. Se muestran las diferencias detectadas el día 1 y 4. El día 2 el ANOVA indicó diferencias significativas, pero los post-hoc no identificaron el origen de estas diferencias.

*BUP10 vs BUP40 y VEH, $p < 0.05$

+BUP10 y BUP20 vs VEH, $p < 0.05$

Escapes

Al realizar el análisis de varianza se encontró que el tratamiento con bupropión influyó significativamente en el número de escapes $F(3,56) = 5.29$, $p < 0.003$. Los análisis post-hoc indicaron que los grupos tratados con BUP10 y BUP20 ($p < 0.05$) realizaron menos escapes que el grupo control. Asimismo, el factor Día $F(3,168) = 157.23$, $p < 0.001$ fue significativo, observándose que con el paso de los días los ratones realizaban menos escapes.

La interacción Día x Tratamiento $F(9,168) = 3.41$, $p < 0.001$ resultó significativa. Los ANOVAS realizados de forma independiente para cada día indicaron que el factor Tratamiento fue significativo en el día 1 $F(3,56) = 8.12$, $p < 0.001$, día 2 $F(3,56) = 2.78$, $p < 0.05$ y día 4, $F(3,56) = 4.59$, $p < 0.001$. En el día 1 los animales tratados con BUP40 realizaron más

escapes que los que recibieron BUP10, BUP20 o suero fisiológico ($p < 0.05$). La prueba post-hoc no detectó las diferencias en el día 2. Se hallaron diferencias significativas entre el grupo tratado con bupropión y el grupo control en el día 4 de modo que los ratones tratados con BUP10 y de BUP20 realizaron menos escapes que los tratados con suero fisiológico ($p < 0.05$).

No respuestas

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al factor Tratamiento y a la interacción Día x Tratamiento. En cambio, el factor Día $F(3,168) = 13.81$, $p < 0.001$ alcanzó la significación estadística, aunque las pruebas post-hoc no detectaron el origen de esas diferencias.

Latencia de respuestas

El análisis de la latencia de respuesta reveló que el factor Tratamiento $F(3,56) = 3.88$, $p < 0.01$ resultó estadísticamente significativo. Las pruebas post-hoc indicaron que los grupos BUP10 y BUP20 mostraron latencias más cortas que el grupo control ($p < 0.05$). El factor Día fue significativo $F(3,168) = 31.67$, $p < 0.001$, reflejando una disminución de latencia de respuesta a medida que transcurrían los días.

Los ANOVAS realizados de forma independiente para cada día indicaron que el factor Tratamiento fue estadísticamente significativo en el día 3 $F(3,56) = 5.23$, $p < 0.005$, y día 4, $F(3,56) = 4.37$, $p < 0.001$ (ver figura 3). En el día 3 los ratones tratados con BUP10 y BUP20 mostraron menor latencia de respuesta que los que recibieron suero fisiológico ($p < 0.05$). Se hallaron también diferencias significativas entre el bupropión y el grupo control en el día 4 en esta medida. Los ratones tratados con las dosis BUP20 y BUP40 registraron menores latencias que los tratados con suero fisiológico ($p < 0.05$) (ver Figura 1.3).

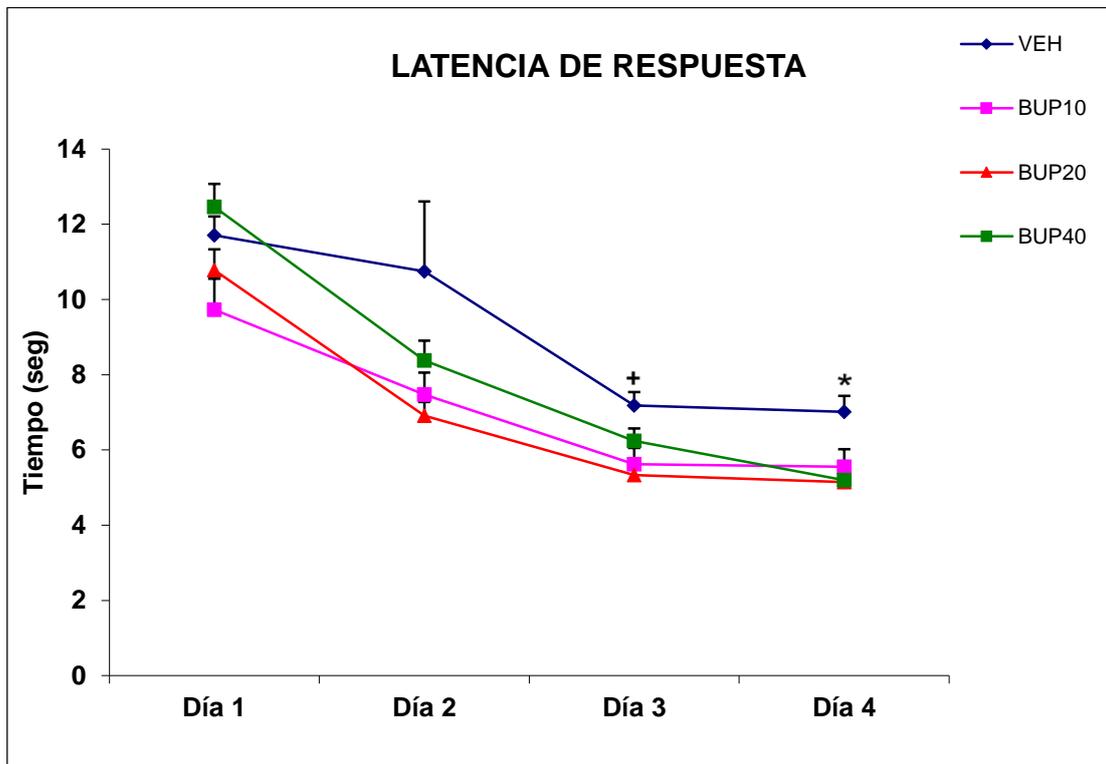


Figura 1.3: Latencia de respuesta (\pm SEM) de los diferentes grupos tratados con las dosis (40, 20, 10 mg/kg) de bupropión y vehículo durante los 4 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa.

+BUP10 y BUP20 vs VEH, $p < 0.05$

*BUP40 y BUP20 vs VEH, $p < 0.05$

Cruces durante el periodo de adaptación

Los resultados mostraron que no había diferencias significativas respecto al factor Tratamiento y a la interacción Día x Tratamiento entre los grupos en el número de cruces de adaptación. El factor Día resultó estadísticamente significativo $F(3,168) = 10.07$, $p < 0.001$. Los análisis realizados de forma independiente para cada día indicaron diferencias en el día 3 $F(3,56) = 2.93$, $p < 0.005$. En este día, los ratones tratados con BUP40 disminuyeron significativamente el número de cruces de adaptación en comparación con la dosis BUP20 ($p < 0.05$).

Cruces en el intervalo ITI

El factor Tratamiento mostró una tendencia a la significación en el número de cruces durante el ITI $F(3,56)= 2.60$, $p<0.06$. Los análisis post-hoc indicaron que el grupo BUP20 realizó más cruces que el grupo control ($p<0.01$) o el grupo BUP40. El factor Día resultó estadísticamente significativo $F(3,168)= 31.1$, $p<0.001$ detectándose un aumento de los cruces a medida que pasaban los días. La interacción Día x Tratamiento también fue significativa $F(9,168)= 2.35$, $p<0.016$. Las diferencias en el factor Tratamiento alcanzaron la significación estadística en los días 3 $F(3,56)= 4.97$, $p<0.01$ y 4 $F(3,56)= 2.73$, $p<0.05$. El análisis post-hoc evidenció que los ratones tratados con la dosis de BUP20 mostraron un mayor número de cruces que los tratados con el suero fisiológico ($p<0.05$).

3.2. Fase de retención (día 5)

Como se ha mencionado anteriormente, los efectos en la retención fueron evaluados en el día 5, durante el cual la mitad de los ratones tratados con bupropión continuaron recibiendo las mismas dosis que habían sido administradas durante los días 1-4 y la otra mitad de los animales se les administró otra dosis diferente. También los animales del grupo control se subdividieron, manteniendo la mitad de los ratones el mismo tratamiento (suero fisiológico) mientras a la otra mitad se les administraron diferentes dosis de bupropión.

El ANOVA no mostró efectos en el Tratamiento en las diferentes medidas registradas, pero indicó una tendencia ($p<0.07$) respecto a la tasa de aprendizaje, observándose una mejoría en los ratones que habían recibido las diferente dosis de bupropión (10, 20 y 40 mg/kg) durante los cuatro días de adquisición de la tarea y que el quinto día recibieron únicamente suero fisiológico, en comparación con los que habían recibido el tratamiento con bupropión durante los cinco días del experimento (ver Figura 1.4).

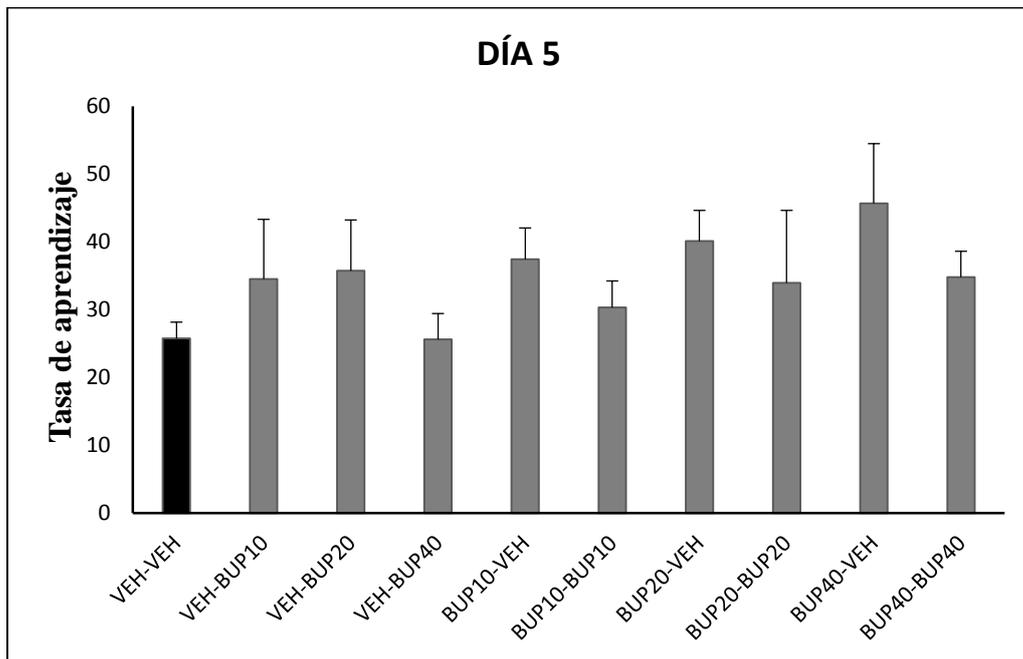


Figura 1.4 Media de la tasa de aprendizaje durante el día 5 en el condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI.

4.- DISCUSIÓN

El objetivo principal de este experimento fue investigar si el bupropión modula la capacidad de aprendizaje del condicionamiento de evitación activa en ratones. Para ello, inicialmente analizamos el efecto del bupropión en los 4 días de adquisición de la tarea. En este experimento también nos interesó determinar cómo el tratamiento agudo de bupropión podía influir en el rendimiento en esta tarea al modificar el tratamiento en el quinto día de la prueba.

Los efectos del bupropión en el condicionamiento de evitación activa durante la fase de adquisición (días 1 a 4) muestran que los grupos tratados con las dosis bajas e intermedias (10 y 20 mg/kg) presentan un incremento en el número de evitaciones. La latencia de respuesta confirmó esta mejora, ya que este parámetro también se redujo durante las sesiones. En la sesión 3, los animales tratados con 10 y 20 mg/kg de bupropión exhibieron unas latencias de respuesta más cortas que los que recibieron vehículo. En la sesión 4, los ratones tratados con 20 y 40 mg/kg mostraron latencias de respuesta más cortas que los controles. Ambas conductas se interpretan generalmente como una mejoría de la respuesta de los ratones en la adquisición de la tarea de evitación. Este hallazgo sugiere que el bupropión puede facilitar la conducta de evitación, confirmando estudios previos con este fármaco que indican una mejora en otras tareas de aprendizaje, tales como la recuperación en el test de evitación inhibitoria (Barros y cols., 2002), condicionamiento de preferencia de lugar (Ortmann, 1985) o en la respuesta emocional condicionada (Lipina y Roder, 2010; Carmack y cols., 2014). Además, estos datos están de acuerdo con observaciones anteriores que muestran que el bupropión invierte el deterioro inducido por la reserpina en la tarea de evitación condicionada (Nakagawa y cols., 1997).

Teniendo en cuenta que la tarea de evitación activa es una forma relativamente compleja de aprendizaje en el que los animales tienen que aprender a ejecutar una determinada respuesta para evitar la aplicación de una descarga eléctrica suave en las patas del animal (factor estresante), el rendimiento tras la administración de bupropión durante las sesiones (incremento en el número de evitaciones y disminución de la latencia de la respuesta) sugiere que este fármaco puede mejorar el control de las respuestas emocionales. Al interpretar estos resultados, se debe tener presente que, como se sugirió anteriormente (Vaglenova y cols., 2004), el comportamiento exhibido por los animales en el modelo de

evitación activa desempeñan un papel muy relevante en factores emocionales como la ansiedad o el miedo.

El aumento en el número de evitaciones suele interpretarse como la respuesta óptima para los ratones en la tarea de evitación activa, y nuestros resultados indican que los ratones tratados con bupropión (10 y 20 mg/kg) muestran un estilo de afrontamiento más activo que el grupo de control. Aunque la actividad locomotora no se evaluó directamente en el presente experimento, hay que tener en cuenta que a lo largo del periodo de adaptación, durante el cual los ratones podrían explorar el aparato durante 3 minutos antes de cada sesión (tanto en las fases de adquisición y retención), no se observan diferencias significativas entre los grupos en el número de cruces, lo que sugiere que esta medida indirecta de la locomoción no se vio afectada por el tratamiento con bupropión ni durante el aprendizaje ni durante la retención de la tarea. Teniendo en cuenta el número total de respuestas de evitación y la latencia de respuesta de cada grupo, nuestros resultados sugieren una mejora general en el aprendizaje en los grupos tratados con bupropión.

Un resultado interesante se obtuvo en la fase de retención, al comparar el rendimiento de los diez grupos experimentales evaluados en el estudio, ya que nuestros resultados indican que todos los animales mostraron un buen recuerdo de la tarea. En esta fase, la mitad de los ratones en cada grupo tratado con bupropión continuó el tratamiento con la misma dosis de bupropión y la otra mitad comenzó a recibir solución salina. Además, los veinticuatro animales incluidos en el grupo de control se subdividieron en cuatro grupos (tratados con 10, 20, 40 mg / kg de bupropión o vehículo). Los resultados obtenidos indicaron que no hubo diferencias significativas en el rendimiento entre grupos durante la retención de la tarea de evitación activa. De hecho, los animales tratados con bupropión parecen mostrar una memoria emocional similar a los del grupo de control. En este sentido, la falta de efectos claros en el rendimiento podría atribuirse a un posible efecto "techo" ocasionado por el elevado número de evitaciones alcanzado el último día de adquisición en algunos de los grupos tratados con bupropión. Por lo tanto, el bupropión no parece mejorar significativamente la retención de la tarea de evitación activa en ratones "expertos", aunque el menor número de animales que formaban parte de cada sub-grupo cuando el tratamiento fue modificado el día 5 puede ser un factor relevante que debe ser tenido en cuenta.

Se ha sugerido que los efectos de bupropión pueden depender del nivel de desempeño mnemónico de los animales, ya que este fármaco atenúa la mejora de la memoria inducida

por la nicotina en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos, e impide el deterioro de la memoria inducida por la escopolamina (Kruk-Słomka y cols., 2014). Otros autores empleando el laberinto elevado, que también se ha empleado en algunos estudios con el fin de evaluar los cambios en la memoria, han observado que el bupropión modula las respuestas relacionadas con la memoria inducidas por la nicotina (Biala y Kruk, 2009;. Kruk y cols., 2011).

En conclusión, podemos afirmar que el bupropión modula la ejecución de la tarea del condicionamiento de evitación activa. Además, los efectos aparentemente beneficiosos del bupropión no pueden atribuirse solo a su influencia sobre la actividad motora, aunque podrían estar moduladas por dicha actividad.

EXPERIMENTO 2. EFECTOS DEL BUPROPIÓN SOBRE EL APRENDIZAJE ESPACIAL

MATERIAL Y MÉTODO

1.1. Animales

En este experimento se emplearon 88 ratones macho de la cepa NMRI obtenidos de los laboratorios Charles-River (Barcelona-España). A su llegada al laboratorio, los ratones adolescentes tenían unos 23 días de edad y un peso aproximado de 11-14 gr y los ratones adultos unos 52 días de edad y un peso aproximado de 22-27 gr. Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en el experimento anterior.

1.2. Aparatos

- Laberinto de agua o *water maze* basado en el descrito por Morris (1984) y adaptado para ratones.

El aparato consistía en una piscina circular de 1 m de diámetro y 30 cm de altura. El tanque era de metacrilato, las paredes negras y el fondo transparente. El laberinto se colocó sobre una placa circular de metacrilato blanco en la que estaban marcados los cuatro cuadrantes (NO, NE, SO y SE) con el fin de poder visualizar en las grabaciones en que cuadrante se situaba el animal en la prueba final.

- Equipo de video SONY. Cámara de video Panasonic NV-DS27EG.
- Ordenador PC con programa “Ratón Time” (Brain y cols., 1989) para la evaluación de las 11 categorías conductuales
- Cronómetro digital CASIO: utilizado para medir las latencias de escape durante los ensayos.

El resto de material fue el mismo que el empleado en el Experimento 1.

1.3. Tratamiento farmacológico

El fármaco utilizado fue bupropión (Bupropion Hydrochloride) obtenido comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España), que se disolvió en suero fisiológico para obtener la concentración deseada para cada dosis. Se utilizaron 3 dosis: 10, 20 y 40 mg/kg de bupropión. Todas las dosis fueron administradas en inyecciones con un volumen de 10 ml/kg.

1.4. Procedimiento

El periodo de adaptación de los animales desde su llegada al laboratorio hasta la realización del experimento fue de 12 días. El laberinto de agua fue diseñado por Morris para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, 1984). La prueba se desarrolla en una piscina circular que se divide en cuatro cuadrantes imaginarios (designados como noroeste NO, suroeste SO, noreste NE y sureste SE). Dicho recipiente se llenó de agua transparente hasta unos 15 cm de altura. No se utilizó ningún colorante para el agua ya que el animal nada con la cabeza por encima de la superficie y la plataforma no resulta visible al encontrarse en un nivel más bajo, tal como han informado diversos autores (Vicens y cols., 2003). La temperatura del agua se mantuvo alrededor de 24°. La plataforma de escape (6 x 6 cm) se situó en el cuadrante NO, un centímetro por debajo de la superficie del agua. En las paredes del laboratorio se colocaron numerosas señales visuales o posters para facilitar la orientación espacial del animal.

El procedimiento seguido para el estudio fue similar al descrito previamente en otros trabajos (Moragrega y cols., 2005; Vicens y cols., 2003). En una primera fase de adquisición o entrenamiento el animal era colocado durante 30 segundos en la plataforma antes del primer ensayo y, pasado este tiempo, se le introducía en la piscina con el hocico apuntando a una de las paredes y se le dejaba nadar libremente durante 60 segundos. Si el animal alcanzaba la plataforma de escape, permanecía en ella durante 30 segundos. En el caso de que no la hallara, el experimentador situaba al animal en la plataforma.

En cada ensayo la posición de salida se situaba en uno de los diferentes cuadrantes. El intervalo (ITI) entre ensayos fue de 30 seg durante los cuales el animal se alojaba en una jaula individual. El experimentador anotaba el tiempo que el animal tardaba en encontrar la plataforma (latencia de escape). Este procedimiento de ensayo se repitió con cada animal con 4 entrenamientos consecutivos por día, en cada uno de estos ensayos de entrenamiento se registró la latencia de escape con un cronómetro. La capacidad del animal para localizar eficientemente la plataforma depende de la utilización de las claves extra-laberinto. Esta fase de adquisición o aprendizaje tuvo una duración de 5 días. Finalizado el entrenamiento, el último día se llevó a cabo la prueba final ("probe trial") en la cual se quitaba la plataforma y se dejaba que el animal nadase libremente durante 60 seg y se registraba el tiempo que el animal pasaba en cada cuadrante. Se hipotetiza que si el animal ha aprendido la tarea de forma

eficiente nadará más tiempo en el cuadrante meta, es decir, donde previamente estaba situada la plataforma. La ejecución del último día fue grabada mediante una videocámara situada en una esquina de la habitación. Estas grabaciones se visualizaron posteriormente y se analizaron mediante el programa “Raton Time” que permite valorar el tiempo dedicado a cada conducta mediante el uso de distintas claves para cada conducta.

Las medidas evaluadas fueron la latencia de escape que los animales realizaron a lo largo de los días de entrenamiento y el porcentaje de tiempo que los animales pasaban en cada cuadrante durante la prueba final. Los animales adolescentes y adultos fueron distribuidos en cuatro grupos según el tratamiento experimental que recibieron: BUP10, BUP20, BUP40 o VEH (grupo control).

1.5. Evaluación de la ejecución

Para el análisis conductual del laberinto de agua las medidas que se evaluaron fueron:

1. Latencia de escape: tiempo que transcurre desde que se coloca al animal en la piscina hasta que alcanza la plataforma, sube a ella y permanece en la misma durante al menos cinco segundos. La adquisición de la respuesta se refleja en las latencias de escape más bajas que van alcanzando los animales a lo largo de los sucesivos días de entrenamiento (Gallagher y cols., 1993).

2. Porcentaje de búsqueda en el cuadrante de entrenamiento: se define como el porcentaje de tiempo que los animales pasan en el cuadrante donde previamente se encontraba la plataforma de escape en los ensayos de adquisición. Durante la prueba final, la retención de la tarea se refleja en el mayor porcentaje de tiempo que los animales pasan en dicho cuadrante meta (Gallagher y cols., 1993).

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han analizado mediante el ANOVA de la latencia de escape y el tiempo que los ratones pasaban en cada cuadrante de la piscina. Para los análisis post-hoc se aplicó la prueba DHS de Tukey. Se consideraron el factor Tratamiento (bupropión o suero fisiológico) y Edad (adolescentes y adultos) como variables entre-sujeto con cuatro niveles (BUP10, BUP20 y BUP40 o VEH) y los factores Día y Ensayo, con 5 y 4 niveles respectivamente como variables intra-sujeto. En el análisis de los ensayos de la prueba sin

plataforma se consideró el factor Tratamiento como variable entre-sujeto y el factor Cuadrante como variable intra-sujeto.

3. RESULTADOS

En la **fase de adquisición** el análisis indicó que el factor Edad no fue estadísticamente significativo ya que los niveles de eficiencia mostrados por cada uno de los grupos durante la adquisición de la tarea no difieren de forma global entre adolescentes y adultos. Sin embargo, el ANOVA mostró diferencias significativas en los efectos del Tratamiento, $F(3,76)=6.357$, $p<0.001$. Las pruebas a posteriori señalaron que los ratones tratados con la dosis intermedia de bupropión (20 mg/kg) tuvieron una mayor latencia de escape que la dosis de 10 mg/kg de bupropión ($p<0.001$) y el suero fisiológico ($p<0.05$). Las diferencias halladas con el resto de las dosis no resultaron significativas. El factor Día resultó estadísticamente significativo, $F(4,304)=111,830$, $p<0.001$, evidenciando que a medida que transcurrían los días, los ratones mostraban menor latencia de escape. Respecto a la interacción Día x Tratamiento se hallaron diferencias significativas, $F(12,304)=2,751$, $p<0.001$, así como en la interacción Edad x Tratamiento $F(3,76)=7.336$, $p<0.001$. Con el fin de analizar con mayor profundidad dicha interacción, se realizaron análisis separados para valorar la ejecución en los ratones adolescentes y adultos.

En los ratones adolescentes, el ANOVA mostró diferencias significativas en el factor Tratamiento, $F(3,40)=14,26$, $p<0.001$. La prueba Tukey indicó que los ratones tratados con la dosis más alta BUP40 tuvieron una latencia de escape significativamente mayor que BUP10 ($p<0.02$) y VEH ($p<0.001$). Así mismo, se observó que los animales tratados con la dosis intermedia (BUP20) mostraron mayor latencia de escape que los que recibieron BUP10 y VEH ($p<0.001$). Las diferencias encontradas con el resto de dosis no resultaron significativas. El factor Ensayo resultó estadísticamente significativo, $F(3,120)=8,23$, $p<0.001$, así como el factor Día $F(4,120)=2,48$, $p<0.05$, mejorando los animales el aprendizaje cada día.

En los ratones adultos el ANOVA no mostró diferencias significativas en el factor Tratamiento, aunque el factor Ensayo resultó estadísticamente significativo, $F(3,108)=6,617$, $p<0.001$, así como el factor Día $F(4,144)=58,077$, $p<0.001$, indicando que a medida que transcurrían los días los animales realizaban menores latencias de escape (ver Figura 2.2).

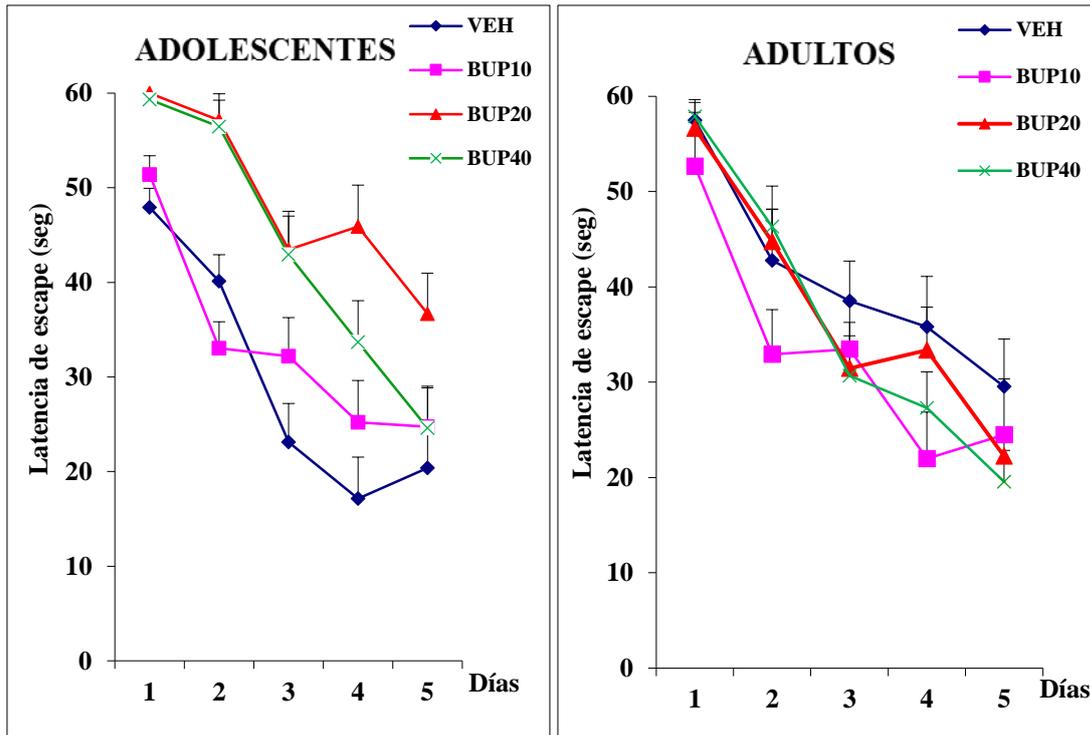


Figura 2.1: Comparación entre las latencias de escape realizadas durante los 5 días de adquisición en el test de aprendizaje espacial en los ratones adolescentes y adultos (para significaciones ver texto).

En el análisis del “probe trial” o **ensayo de prueba** sin plataforma, el factor Edad y el factor Tratamiento no alcanzaron la significación estadística cuando se evaluó el porcentaje en el tiempo que el animal pasaba en cada uno de los cuadrantes durante la prueba final sin plataforma. El ANOVA reveló diferencias significativas en el efecto Cuadrante $F(3,228)=78,576$, $p<0.001$, indicando que los ratones estuvieron más tiempo en el cuadrante NO (en el cual estaba situada la plataforma durante la fase de adquisición).

La interacción Tratamiento x Cuadrante no alcanzó la significación estadística. Con el fin de obtener mayor información se realizó un ANOVA separado para cada grupo de edad considerando ambos factores. Los resultados mostraron que en los ratones adolescentes, el factor Tratamiento no resultó significativo, en cambio, el factor Cuadrante alcanzó la significación estadística, $F(3,120)=71,699$, $p<0.001$, aunque las pruebas post-hoc no identificaba el origen de estas diferencias. En los ratones adultos el factor Tratamiento no fue significativo mientras que las diferencias en el factor Cuadrante si resultaron estadísticamente significativas, $F(3,108)=23,851$, $p<0.001$, pero la prueba post-hoc Tuckey no detectó el origen de estas diferencias.

4.- DISCUSIÓN

El objetivo de este experimento fue evaluar si el bupropión tiene efectos diferenciales entre los ratones adolescentes y adultos en la tarea de aprendizaje espacial. Esta tarea es de adquisición rápida y permite estudiar el efecto del fármaco sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Hodges, 1996). Investigaciones previas sugieren que el bupropión es un antidepresivo que mejora las funciones cognitivas tanto en animales como en humanos (Baune y cols., 2014), si bien hay muy pocos estudios que comparen la capacidad del bupropión para mejorar el aprendizaje espacial en roedores de diferentes edades, incluyendo ratones adolescente y adultos.

Nuestros resultados indican que en los ratones adolescentes el bupropión altera la adquisición de la tarea, pero no afecta a la retención. En cambio, en los ratones adultos, no observamos efectos significativos en la adquisición (las latencias de escape fueron similares en los diferentes grupos) o en la retención. Estos resultados son interesantes puesto que evidencian que el bupropión puede influir sobre la ejecución de una tarea de aprendizaje espacial, dependiendo de la edad de los sujetos. Estos resultados podrían mostrar una sensibilización diferencial en los efectos del fármaco en ratones adolescentes y adultos. En este sentido, se ha hipotetizado que las diferencias individuales en ansiedad pueden modular las tareas de aprendizaje durante la fase de adquisición o en el rendimiento (Bert y cols., 2002) y que la ejecución en tareas de memoria espacial se ve afectada por factores emocionales (Prior y cols., 1997). Se ha observado que los roedores adolescentes muestran diferencias con los adultos en medidas de ansiedad, conductas relacionadas con depresión y reactividad al estrés (Adriani y Laviola, 2004). Existen, sin embargo, pocos estudios que hayan comparado los efectos del bupropión en ratones adolescentes y adultos, aunque estudios recientes en nuestro laboratorio sugieren que los adolescentes son más sensibles a los efectos del bupropión que los adultos (Carrasco y cols., 2013).

En relación con los efectos del bupropión en los ratones adultos no se observa que su administración tenga efectos positivos directos en la ejecución de la tarea. Puesto que la medida utilizada en el análisis conductual de este test de natación es la valoración de la latencia de escape, siendo definido el aprendizaje correcto por presentar latencias de escape más cortas, en nuestro experimento las latencias van disminuyendo en todos los grupos incluyendo el grupo control que recibió suero fisiológico, sugiriendo que el aprendizaje no se ve afectado por el tratamiento con bupropión. Este resultado es en parte consistente con

los obtenidos por Kruk y colaboradores (2011) que demostraron que el tratamiento con las mismas dosis de bupropión que las empleadas en nuestro estudio (10, 20 y 40 mg/kg) no tenían efectos significativos sobre la adquisición y consolidación de la tarea de aprendizaje medido a través del laberinto elevado. Existen, sin embargo, importantes diferencias entre ambos trabajos, ya que en la investigación realizada por estos autores, los ratones utilizados eran de la cepa Swiss y el paradigma conductual empleado fue el laberinto elevado en forma de cruz modificado, que podría influir sobre la ejecución en la tarea de aprendizaje. En cambio, los mismos autores encontraron que la combinación de bupropión y nicotina sí mejoraba la adquisición y consolidación de la memoria (Kruk y cols. 2014).

La segunda medida conductual utilizada para evaluar el aprendizaje es la retención. Para ello se analizó el tiempo que cada animal pasó en el cuadrante noroeste (NO), en el cual había estado situada la plataforma de escape durante la adquisición de la tarea. Se ha sugerido que la latencia para alcanzar la plataforma de escape en el laberinto de agua puede estar influida por efectos motores de los fármacos y por los patrones no espaciales de búsqueda motora. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que el bupropión no tuvo efectos sobre la retención de esta tarea espacial confirmado lo observado en estudios previos (D'Hooge y cols., 1997).

En conclusión, los hallazgos encontrados demuestran los efectos diferenciales de bupropión entre ratones adolescentes y adultos. La interacción entre la edad y el tratamiento indica que los efectos de este fármaco dependen en gran medida de la edad a la que son evaluados los animales. El tratamiento con bupropión no tuvo efectos significativos sobre la adquisición o retención de la tarea espacial en ratones adultos NMRI, aunque deterioraba la adquisición en ratones adolescentes. Serían necesarios más estudios para comparar los efectos de bupropión en diferentes tareas de aprendizaje y/o distintos protocolos de entrenamiento en el laberinto de agua.

ESTUDIO 2

INFLUENCIA DEL BUPROPIÓN

SOBRE EL NIVEL DE

ANSIEDAD

Los estudios realizados tanto con humanos como en modelos animales sugieren que los psicoestimulantes pueden influir sobre las conductas relacionadas con la ansiedad (Walker y cols., 2009). Por otra parte, el estrés y la ansiedad se consideran entre los principales mecanismos que subyacen a la iniciación, mantenimiento y recaída en el consumo de nicotina. Por ejemplo, los fumadores indican que fumar cigarrillos reduce la ansiedad y el estrés, por lo que abandonar dicha adicción resulta difícil. Estudios previos refieren que se produce un aumento de la ansiedad ante la retirada de psicoestimulantes tanto en seres humanos como en animales (Jackson y cols., 2008). El bupropión reduce los síntomas somáticos de la abstinencia a la nicotina e influye en los procesos relacionados con la ansiedad (Malin y cols., 2006).

Se ha comprobado empleando diferentes modelos conductuales con animales que los efectos farmacológicos de la nicotina están mediados por la estimulación directa de los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) y se hipotetiza que son estos los que influyen en las conductas asociadas a la ansiedad (Zarrindast y cols., 2013). Biala y Kruck (2009) indicaron que el bupropión bloqueaba los efectos conductuales de la nicotina y que la acción antagonista del bupropión sobre los nAChRs podrían explicar, en parte, la falta de efectos de la nicotina. También puede influir la acción del bupropión sobre las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, controlando estos sistemas la conducta aversiva e influyendo en la ansiedad (Malin y cols., 2006).

La mayoría de investigadores consideran que cuando los animales se enfrentan a un entorno desconocido o a un objeto nuevo presentan unos patrones de conducta exploratoria variables, que en términos de comportamiento se denomina “neofilia” (atracción o curiosidad hacia un objeto o lugar nuevo) o “neofobia” (aversión o evitación por miedo a un nuevo estímulo) (Hughes, 2007). Dichos cambios han sido descritos empleando diferentes test conductuales como la tabla con agujeros o *hole board* y principalmente el laberinto elevado en forma de cruz o *plus-maze* que permite valorar si un fármaco muestra un perfil ansiolítico o ansiógeno.

El test del *hole board* fue introducido por primera vez por Boissier y Simon (1962). Este paradigma se utiliza por su facilidad de uso, su corta duración y el hecho de que se puede cuantificar de forma automatizada. Por otra parte, dado que distintas drogas alteran la

exploración de los agujeros en el hole board, se ha considerado este índice como un reflejo de la conducta exploratoria (File y Warding, 1975) y de búsqueda de novedad (Aydin y cols., 2012), si bien algunos autores lo equiparan al estado ansioso, en cuyo caso parten del supuesto de que inclinar la cabeza de los animales (head dipping) es inversamente proporcional a su estado de ansiedad. Un número reducido de head dipping reflejaría un nivel de alta ansiedad en animales (Bali y Jaggi, 2015). Otros estudios han tratado de asociar la ansiedad con el porcentaje de cruces centrales en el hole board, siendo éste uno de los índices propuestos para medir la ansiedad. El número de head dips reflejaría la motivación para buscar nuevas experiencias, resultando una medida de búsqueda de novedad que puede expresar la tendencia del individuo a buscar entornos novedosos como resultado de la neofobia (Abreu-Villaça, 2006).

El laberinto elevado es el paradigma más frecuentemente utilizado para evaluar la ansiedad en ratones (Pellow y cols., 1985). La prueba se basa en la aversión natural de los ratones a las áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento de exploración espontánea en ambientes novedosos. El aparato consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados y a los ratones se les permite moverse libremente entre ellos. El número de entradas y tiempo que el animal permanece en los brazos abiertos se utiliza como índice de ansiedad (Falco y cols., 2014). El número de entradas a brazos cerrados es el parámetro que mejor refleja la actividad motora (Pelow y cols., 1985).

Teniendo en cuenta los numerosos estudios que proponen que la adolescencia es un periodo de vulnerabilidad a las drogas, se ha sugerido que los cambios que se producen en el desarrollo del cerebro en la adolescencia podrían predisponer a un individuo a experimentar con las drogas ilícitas, el alcohol y el tabaco (Spear, 2000; Laviola y cols., 2003). En este sentido, se han descrito amplias diferencias conductuales entre ratas adolescentes y adultas, mostrando las adolescentes mayor actividad motora inducida por la búsqueda de novedad, mayor preferencia por la novedad y más conductas exploratorias que las adultas (Stansfield y cols., 2004). En general, las ratas adolescentes presentan menor nivel de ansiedad durante la exploración de nuevos entornos que las adultas (Doremus y cols., 2004). Algunos autores han hipotetizado que el estudio de las diferencias biológicas en la sensibilidad a la nicotina empleando animales adolescentes y adultos puede ayudar a esclarecer los efectos de dicho fármaco en la ansiedad (Kupferschmidt y cols., 2010). Por otra parte, estudios clínicos refieren que el bupropión, que se emplea como tratamiento para

la adicción a la nicotina en adultos (Benowitz, 2009), también resulta útil con fumadores adolescentes (Bailey y cols., 2012). Estudios previos en nuestro laboratorio han sugerido que el bupropión no tiene un perfil claramente ansiolítico cuando sus efectos han sido evaluados en el laberinto elevado en forma de cruz o en el hole board, encontrando que los efectos del bupropión son similares a los de los fármacos con perfil ansiógeno (Redolat y cols., 2005). Además, este fármaco induce cambios diferenciales en la actividad exploratoria y la ansiedad dependiendo de la edad (Carrasco y cols., 2013).

De acuerdo con las consideraciones expuestas previamente, el objetivo del primer experimento fue evaluar los efectos de la nicotina en la búsqueda de la novedad empleando para ello el hole board o tabla de agujeros en ratones de diferentes edades. En el segundo y tercer experimento evaluamos el efecto de la coadministración de bupropión y nicotina en roedores de diferentes edades empleando como test conductual el hole board y el laberinto elevado en forma de cruz.

EXPERIMENTO 3. EFECTOS DE LA NICOTINA SOBRE LA CONDUCTA EXPLORATORIA Y BÚSQUEDA DE LA NOVEDAD

1. MATERIAL Y METODO

1.1. Animales

En este experimento se emplearon 72 ratones macho de la cepa NMRI. A su llegada al laboratorio los ratones adolescentes tenían 23 días de edad y un peso aproximado de 11-14 gr y los ratones adultos 52 días de edad y un peso aproximado de 22-27 gr. Los ratones NMRI se están utilizando cada vez más en los experimentos comportamentales (Van Goethem y cols., 2012) y se han empleado en nuestro laboratorio con el fin de establecer un perfil conductual de la nicotina y otros fármacos (Carrasco y cols., 2006). Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en el experimento anterior.

1.2. Aparatos

- Tabla con agujeros o “hole board” o (CIBERTEC, España). Caja de 32x32x29 cm realizada en Plexiglás negro con 16 agujeros equidistantes de 2.2 cm de diámetro. Las paredes del “hole-board” son transparentes y en el suelo hay sensores de células fotoeléctricas que registran de forma automática las veces que el animal mete la cabeza en dichos agujeros.
- El resto de material fue el mismo que el empleado en los anteriores experimentos.

1.3. Tratamiento farmacológico

El fármaco utilizado fue (-)-nicotina di-(+) tartrato sal que se obtuvo comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El fármaco se disolvió en suero fisiológico y una vez disuelta la base de nicotina con el suero, el pH de la nicotina fue ajustado a 7 con hidróxido de sodio (NaOH). Los animales recibieron una inyección sc de nicotina o suero 15 minutos antes de la realización del test. Las dosis de nicotina fueron 0.25 mg/kg (NIC0.25), 0.5 mg/kg (NIC0.5) y 1 mg/kg (NIC1). Dichas dosis fueron seleccionadas teniendo en cuenta los estudios previos acerca de los efectos conductuales de la nicotina en roedores (Kruk y cols., 2011) y sobre la actividad espontánea en ratones NMRI adolescentes y adultos (Carrasco y cols., 2006; Moragrega y cols., 2005; Redolat y cols., 2009).

1.4. Procedimiento

Los ratones adolescentes (n=40) fueron evaluados cuando alcanzaron la edad de 34-35 días y los adultos (n=32) a los 60 días de edad. A la llegada al laboratorio se asignaron aleatoriamente a los 4 grupos de tratamiento, en el grupo de adultos el número de sujetos fue de (n = 10) y en el de adolescentes (n = 8). Los grupos experimentales fueron NIC0.25 (0.25 mg/kg), NIC0.5 (0.5 mg/kg), NIC1(1 mg/kg) y VEH (suero fisiológico).

Para evaluar la conducta de los animales en la tabla de agujeros al principio de cada prueba se colocaba al ratón en el área central dejándole explorar el aparato durante cinco minutos. Se anotaba manualmente en una hoja de registro la latencia al primer “head-dipping”(HD), es decir, el tiempo que transcurría desde el inicio de la prueba hasta que el animal metía la cabeza en alguno de los agujeros que se encontraban en el suelo por primera vez. También se registraron de forma automática las veces que el ratón metió la cabeza en los agujeros (número total de HD). Cada animal experimental era sometido a un único test y el aparato era limpiado después de cada prueba. Las conductas mostradas por los ratones en la tabla de agujeros fueron grabadas con una cámara de video y después analizadas por un observador “ciego” a las condiciones del test, utilizando un método computerizado con la ayuda del “Ratón-time” (Brain y cols., 1989) mediante el cual se realizó un análisis etológico de las siguientes conductas:

1. Erguirse, se valoró:

- Erguirse apoyado en la pared (el animal se levanta sobre sus patas traseras apoyándose en la pared del aparato).

- Erguirse sin apoyarse en la pared (se levanta sobre sus patas traseras y no se apoya en la pared).

- Número total de veces que realiza la conducta de erguirse, (número de veces que el animal se pone erguido, tanto apoyado como sin apoyarse en la pared).

2. Cuidado corporal, incluyendo:

- Autoaseo (se lame el pelo, bien en los flancos, el abdomen o el rabo).

- Aseo abreviado (rápida limpieza de cabeza y nariz con las patas delanteras).

- Rascarse (se rasca los flancos y la cabeza con las patas traseras).

- Lavado (se lame las patas delanteras y las pasa repetidamente sobre su cabeza, desde las orejas hasta la nariz).

Se considera que en la tabla de agujeros el número de veces que los ratones realizan la conducta de erguirse y aseo están relacionados con la actividad motora, mientras que el número de HD y la latencia al primer de HD mostrada por los ratones son indicativos de los efectos del fármaco sobre la ansiedad (Takeda y cols., 1998; Redolat y cols., 2005). El número de HD se relaciona con la exploración de un nuevo entorno y se utiliza con frecuencia para evaluar el comportamiento de búsqueda de novedad (Vaglenova y cols., 2004; Abreu-Villaça y cols., 2006).

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos han sido analizados mediante ANOVAS. Las medidas consideradas fueron:

a. Análisis automático

a.1. Frecuencia de HD

b. Análisis etológico

b.1. Latencia al primer HD

b.2. Frecuencia de erguirse apoyado en la pared.

b.3. Frecuencia de erguirse sin apoyarse en la pared.

b.4. Frecuencia total de erguirse

b.5. Frecuencia que muestran de la conducta de cuidado corporal.

Las diferencias entre grupos experimentales se analizaron mediante el test DHS de Tukey, considerándose estadísticamente significativo a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Análisis conjunto adolescentes y adultos

El análisis de varianza mostró que el factor Edad fue estadísticamente significativo al analizar el tiempo que tardan los animales en realizar el primer HD $F(1,74)= 12.09$, $p<0.004$ y la frecuencia de erguirse con pared $F(1,74)=1.83$, $p<0.001$. Las pruebas a posteriori señalaron que los ratones adolescentes disminuyeron la latencia al primer HD y aumentaron la conducta de erguir con pared en comparación con los adultos ($p<0.001$) y ($p<0.01$) (ver figura 3.1).

El ANOVA también indicó que las diferencias en el factor Tratamiento alcanzaron la significación en las siguientes conductas: latencia al primer HD $F(3,74)= 3.74$, $p<0.02$; frecuencia de HD, $F(3,74)= 14.89$, $p<0.001$; frecuencia de erguir con pared $F(3,74)=13.50$, $p<0.001$ y sin pared $F(3,74)=8.88$, $p<0.001$, y la frecuencia del total de erguirse $F(3,74)=15.02$, $p<0.001$. El análisis post-hoc evidenció que el grupo tratado con la dosis más alta de nicotina NIC1 disminuyó el número de HD respecto a los grupos NIC0.25 y VEH ($p<0.001$). Por último, se halló que los ratones tratados con NIC1 realizaron con menor frecuencia la conducta de erguir, tanto con o sin pared, en comparación con los animales tratados con NIC0.25, NIC0.5 y VEH ($p<0.001$).

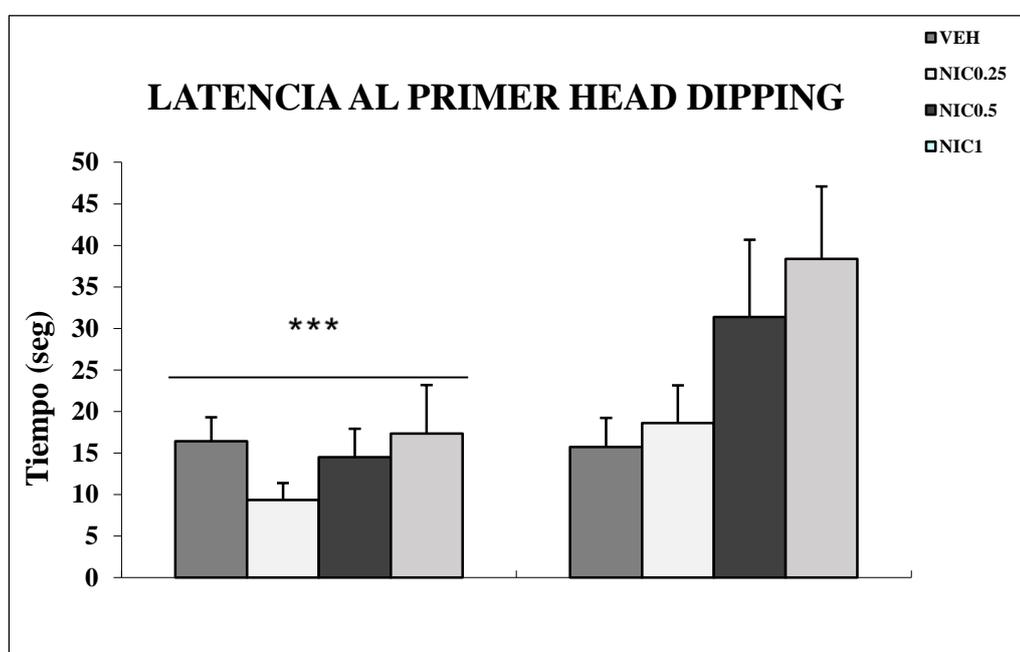


Figura 3.1. Efectos de la administración aguda de nicotina en la latencia al primer HD en ratones NMRI adolescentes y adultos en la tabla de agujeros.

*** $p<0.001$ ADOLESCENTES vs ADULTOS

En este ANOVA general no se observaron diferencias significativas respecto a la interacción entre los factores Edad y Tratamiento. En un intento de analizar los datos con mayor profundidad y no perder información realizamos un análisis pormenorizado, diferenciando los datos registrados de los ratones adolescentes por un lado y los adultos por otro.

Adolescentes

La tabla 3.1 muestra los resultados de la administración aguda del tratamiento con nicotina de las dosis 0.25, 0.5 y 1 mg/kg o vehículo en la tabla de agujeros en los ratones adolescentes machos NMRI en las siguientes categorías conductuales: número total de HD; latencia al primer HD; frecuencia de erguirse con pared; frecuencia de erguirse sin pared; frecuencia total de erguir; y cuidado corporal. Los datos se presentan en las medias \pm SEM.

Tabla 3.1: Efectos de la administración aguda del tratamiento con nicotina de 0.25, 0.5 y 1 mg/kg o vehículo (VEH) en el “hole-board” en ratones adolescentes.

Categorías conductuales	VEH	NIC0.25	NIC0.5	NIC1
Total HD	19.56 \pm 1.72	23.5 \pm 2.26	18.25 \pm 2.51	13 \pm 2.73
Latencia al primer HD	16.44 \pm 2.87	9.38 \pm 2	14.50 \pm 3.41	17.33 \pm 5.86
Frecuencia de erguir con pared	37.11 \pm 4.28	25.50 \pm 4.9	29.38 \pm 4.06	8.56 \pm 3.28***
Frecuencia de erguir sin pared	11.89 \pm 2.30	13.38 \pm 2.88	13.13 \pm 1.84	2.11 \pm 0.74***
Frecuencia de erguirse	49 \pm 5	38.88 \pm 6	42.51 \pm 4.9	10.67 \pm 3.9***
Cuidado corporal	2.22 \pm 0.78	2.25 \pm 0.76	3.13 \pm 0.99	1.67 \pm 0.74

***p< 0.001 NIC1 vs VEH

El ANOVA mostró que el tratamiento influyó significativamente en el número de veces que los ratones adolescentes realizaron las conductas de HD $F(3,30)= 3.925$, $p<0.018$; erguirse con pared $F(3,30)=11.210$, $p<0.001$; erguirse sin pared $F(3,30)=7.960$, $p<0.001$; y total de erguirse $F(3,30)=13.9$, $p<0.001$. El análisis post-hoc indicó que los ratones que recibieron la dosis más alta de nicotina NIC1 mostraron una disminución de la conducta de erguir con y sin pared y en el total de erguirse respecto a los animales tratados con NIC0.25 ($p<0.05$), NIC0.5 ($p<0.05$) y vehículo VEH ($p<0.001$) (ver figura 3.2). El resto de conductas no resultaron estadísticamente significativas.

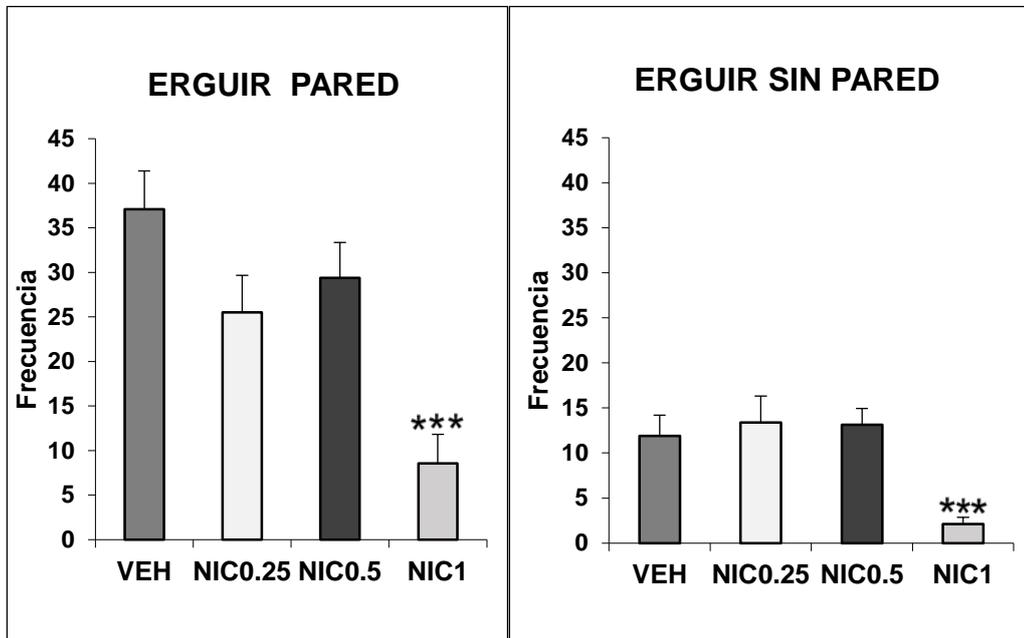


Figura 3.2. Efectos de la administración aguda de nicotina en las conductas de erguir con pared y erguir sin pared en ratones NMRI adolescentes en el test del “hole board”.
*** $p< 0.001$ NIC1 vs VEH

Adultos

En la tabla 3.2 quedan reflejados los resultados obtenidos en las siguiente categorías conductuales: total de HD; latencia al primer HD; erguirse con pared, erguirse sin pared; el total de erguir; y cuidado corporal, tras la administración aguda de nicotina de las dosis 0.25, 0.5 y 1 mg/kg o vehículo en el la tabla de agujeros con ratones adultos machos NMRI. Los datos se presentan en las medias \pm SEM.

Tabla 3.2: Efectos de la administración aguda del tratamiento con nicotina de 0.25, 0.5 y 1 mg/kg o vehículo (VEH) en el “hole-board” en ratones adultos.

Categorías conductuales	VEH	NIC0.25	NIC0.5	NIC1
Total HD	23.9 \pm 3.18	24.6 \pm 3.42	14.5 \pm 2.43	7.75 \pm 1.96***
Latencia al primer HD	15.7 \pm 3.49	18.6 \pm 4.53	31.4 \pm 9.3	38.4 \pm 8.7
Frecuencia de erguir con pared	24.5 \pm 4.2	21.1 \pm 2.19	13.9 \pm 4.67	8.00 \pm 4.29*
Frecuencia de erguir sin pared	19.6 \pm 3.25	13.6 \pm 3.43	9.50 \pm 3.8	5.50 \pm 2.57*
Frecuencia de erguirse	44.1 \pm 6.40	34.7 \pm 4.57	23.4 \pm 8.26	13.5 \pm 6.68
Cuidado corporal	3.12 \pm 1.17	3.37 \pm 0.7	3.62 \pm 1.14	1.25 \pm 0.53

***p< 0.001 NIC1 vs VEH

*p< 0.05 NIC1 vs VEH

El ANOVA reveló que el tratamiento agudo con nicotina influyó significativamente en la frecuencia con que los ratones realizaron las conductas de HD $F(3,28)= 9.72$, $p<0.001$; erguir con pared $F(3,28)=4.11$, $p<0.02$; erguirse sin pared $F(3,28)=3.94$, $p<0.02$ y total de erguir $F(3,28)=4.65$, $p<0.009$.

Los ratones tratados con la dosis más elevada de nicotina (NIC1) presentaron una disminución del número de HD más significativa que los tratados con vehículo VEH ($p<0.001$). Asimismo, los ratones que recibieron NIC1 redujeron la frecuencia de erguirse, realizando menos esta conducta tanto con y sin pared en comparación con los que fueron tratados con vehículo VEH ($p<0.05$) (ver figura 3.3). Respecto a la conducta

de cuidado corporal y latencia al primer HD no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

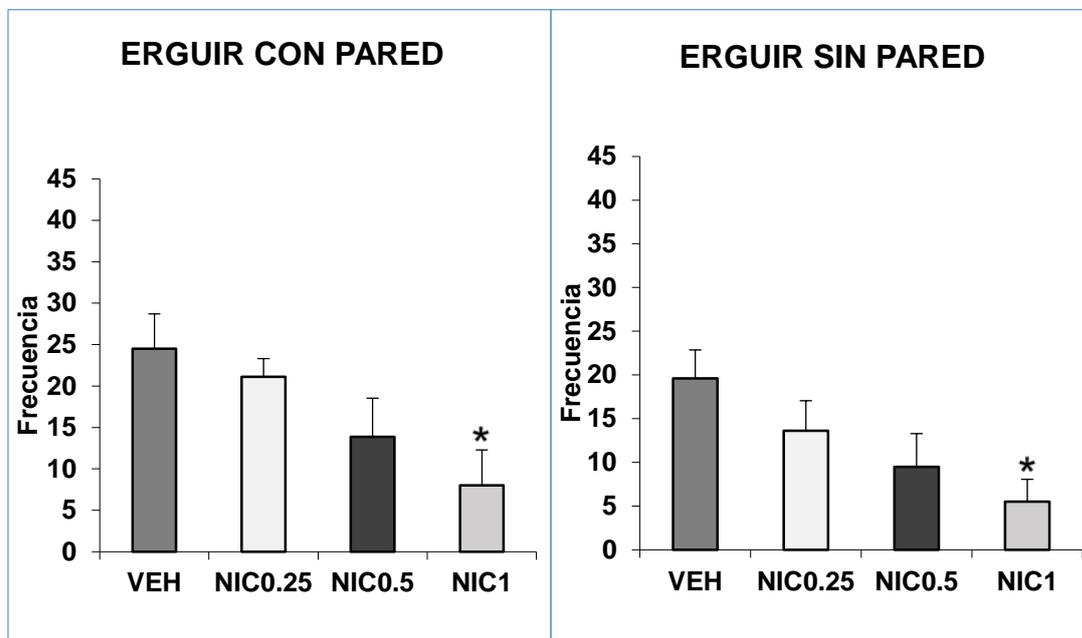


Figura 3.3. Efectos de la administración aguda de nicotina en las conductas de erguir con pared y erguir sin pared en ratones NMRI adultos en el test del “hole board”.

* $p < 0.05$ NIC1 vs VEH

4. DISCUSIÓN

Los mecanismos neurobiológicos que subyacen a los efectos agudos y crónicos de la nicotina han sido estudiados ampliamente utilizando enfoques farmacológicos con modelos animales (Budzynska y cols., 2015). Estudios previos indican que la nicotina puede incrementar, no modificar o disminuir el head dipping en la tabla de agujeros, aunque en general este fármaco disminuye la actividad motora y la exploración (Marco y cols., 2005). Recientes investigaciones con roedores confirman que el tratamiento con nicotina disminuye el head dipping tanto en ratas (Casarrubea y cols., 2015) como en ratones (Nasehi y cols., 2011). Nuestros resultados confirman que el tratamiento con la dosis más alta de nicotina reduce el número de head-dipping y aumenta la latencia al primer HD, lo que se interpreta como una disminución de la búsqueda de la novedad y de la motivación para buscar nuevas experiencias (Kliethermes y Crabbe, 2006). Dicha conducta es considerada como una medida de la exploración dirigida y parece ser independiente de la actividad motora general de animal (Rogers y cols., 1999).

El fenotipo conductual de los adolescentes difiere en muchos aspectos de los adultos, incluyendo una mayor impulsividad, asunción de riesgos y pobre control inhibitorio. Además, la toma de decisiones en esta edad se ve afectada por la maduración incompleta de las conexiones fronto-estriadas (Somerville y Casey, 2010). Los resultados hallados en el presente trabajo indican que los ratones adolescentes aumentan la conducta exploratoria y la búsqueda de novedad en la tabla de agujeros en comparación con los adultos, independientemente del tratamiento, disminuyendo la latencia al primer head dipping, y confirmando las hipótesis que sugiere que los adolescentes muestran una mayor búsqueda de novedad.

Los estudios preclínicos realizados con ratas muestran que la exposición a la nicotina durante la adolescencia temprana incrementa la posterior autoadministración de esta sustancia en la edad adulta (Ahsan y cols., 2014). Algunos estudios han demostrado que el nivel de novedad, evaluado en el hole board, predice la ingestión oral de nicotina en ratones adolescentes, de forma que los ratones clasificados como alta búsqueda de la novedad presentan un marcado incremento en el consumo de nicotina. Estos resultados apoyan la tesis de que un elevado nivel de búsqueda de la novedad durante la adolescencia podría ser un factor responsable del incremento de la vulnerabilidad a la nicotina en este periodo evolutivo (Abreu-Villaça y cols., 2006).

En el presente experimento la dosis más alta de nicotina (1mg/kg) administrada a los ratones adultos disminuyó el número total de HD e incrementó la latencia al primer HD, sin embargo en el caso de los adolescentes la nicotina no tuvo efectos significativos en ambas conductas. Estas observaciones indican que el tratamiento con nicotina disminuyó la conducta de búsqueda de novedad en la tabla de agujeros únicamente en los ratones adultos pero no en los adolescentes. Estos resultados se suman a la creciente evidencia de que los adolescentes son más sensibles a los efectos de recompensa y refuerzo de la nicotina. Sin embargo, el mecanismo neurobiológico exacto subyacente es aún desconocido (Ahsan y cols., 2014; Kota y cols., 2007).

Investigaciones previas sugieren que la exposición a la nicotina en roedores adolescentes puede aumentar el riesgo de una respuesta pasiva hacia el estrés en los machos cuando estos ya son adultos, tal como se ha evidenciado en la prueba de natación forzada (Thanos y cols., 2013). Asimismo, Craig y colaboradores (2014) encontraron que existían diferencias sustanciales en la farmacocinética de la nicotina en función de la edad, de tal forma que tras una única dosis, las ratas adolescentes tenían menor cantidad de nicotina en plasma y en el cerebro en comparación con los adultos.

En el presente trabajo se aplicó un método etofarmacológico, que permite realizar una evaluación completa y cuantificar las conductas mostradas por los animales en la tabla de agujeros (Redolat y cols., 2005). En este experimento la administración de la dosis más alta de nicotina (1mg/kg) mostró una reducción de la actividad motora (reflejado en la conducta de erguirse) de forma dosis dependiente en ambos grupos de edad, resultado que concuerda con el obtenido previamente por Damaj y Martin (1993).

Los efectos de la nicotina en el hole board generalmente son complejos de interpretar. Recientes estudios han mostrado que este fármaco ejerce diferentes acciones en las conductas relacionadas con la búsqueda de novedad en ratones adolescentes en función de la dosis empleada. Por ejemplo, incrementando el número de HD y la conducta exploratoria en ratones adolescentes y disminuyéndola a dosis bajas (Abreu-Villaça y cols., 2015). En cambio, en el presente estudio encontramos que el tratamiento con la dosis más elevada de nicotina (1 mg/kg) indujo una fuerte disminución de las conductas de exploración directa (HD) independientemente de la edad. Además, la dosis más baja de nicotina (0.25 mg/kg) causó un incremento de la conducta de exploración (HD) en comparación con el resto de dosis y con el vehículo. Dichos resultados resultan contradictorios con los encontrados por Casarrubea (2015) en los que las ratas adultas

mostraban una disminución del HD en todas las dosis. Una posible explicación a estos efectos contradictorios se puede atribuir a las diferencias en las dosis de nicotina, el tiempo, la edad, la especie o la vía de administración (Goodwin y cols., 2015; Zarrindast y cols., 2012).

En general, los presentes hallazgos apoyan la idea de que los ratones adolescentes son más sensibles a los efectos relacionados con la nicotina en la conducta exploratoria que los adultos. Son necesarios más estudios con mayor rango de dosis y diferentes pautas de administración con el fin de confirmar estas diferencias.

EXPERIMENTO 4. INTERACCIÓN ENTRE BUPROPIÓN Y NICOTINA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA EXPLORATORIA Y LA BÚSQUEDA DE LA NOVEDAD EN RATONES ADOLESCENTES Y ADULTOS

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. Animales

En este experimento se emplearon 190 ratones macho de la cepa NMRI que a su llegada al laboratorio tenían 23 días de edad y un peso aproximado de 11-14 gr. Fueron obtenidos comercialmente de laboratorios Charles-River (Barcelona, España). Los ratones fueron alojados en grupos de cinco, en cajas de plástico opaco de 25 x 25 x 15 cm y mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en el Experimento 1.

1.2. Aparatos

El modelo y material utilizado fue el mismo que el empleado y descrito en el experimento anterior.

1.3. Tratamiento farmacológico

Los fármacos utilizados fueron bupropión (Bupropion Hydrochloride) y (-)-nicotina di-(+) tartrato sal que se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Ambos fármacos fueron disueltos en suero fisiológico. Una vez disuelta la nicotina en forma de sal con el suero, el pH de la nicotina fue ajustado a 7 con hidróxido de sodio (NaOH). Todos los animales recibieron dos tratamientos. Las dosis de bupropión utilizadas fueron: BUP10 y BUP40; y las de nicotina NIC0.5 y NIC1, así como sus posibles interacciones. Todas las dosis fueron administradas en inyecciones con un volumen de 10 ml/kg. Las dosis experimentales fueron seleccionados teniendo en cuenta los estudios previos relativos a las acciones de bupropión y la nicotina sobre el comportamiento de roedores (Carrasco y cols., 2004; Neumeister y Riepe, 2012) y sus efectos sobre la actividad espontánea en los ratones NMRI adolescentes y adultos (Redolat y cols., 2005).

1.4. Procedimiento

El periodo de adaptación de los animales desde su llegada al laboratorio hasta la realización de los experimentos en el caso de los adolescentes fue de 11 días y en los adultos de 37. Los ratones adolescentes (n=95) fueron evaluados cuando alcanzaron la edad de 34-35 días y los adultos (n=95) a los 60 días de edad. El número total de animales fue de 190 animales utilizándose ± 10 para cada dosis y edad. Los animales fueron distribuidos en 9 grupos según el tratamiento experimental que recibían (ver Figura 4.1)

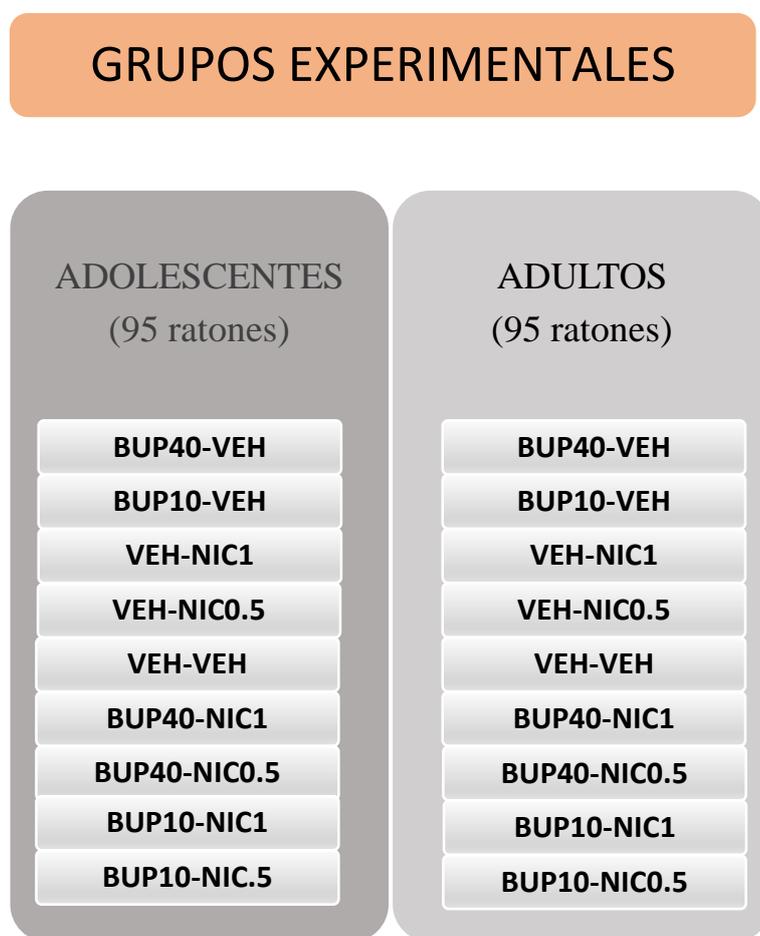


Figura 4.1. Tratamiento farmacológico empleado en los grupos de adolescentes y adultos.

La sala experimental donde se realizaban los tests estaba iluminada débilmente con una luz roja. Con el fin de facilitar la adaptación de los ratones se les llevaba al laboratorio una hora antes de la prueba experimental. En función del grupo asignado, los animales recibieron dos inyecciones, la primera fue una inyección intraperitoneal de 10 o 40 mg/kg de bupropión o suero fisiológico, 15 minutos después recibieron la segunda

inyección subcutánea de 0.5mg/kg o 1 mg/kg de nicotina o suero fisiológico de modo que los tratamientos quedaron de la siguiente forma, tratamiento único: NIC0.5 y NIC 1 (0.5 o 1 mg/kg de nicotina) y BUP10 y BUP40 (10 o 40 mg/kg de bupropión) o la interacción entre ambos fármacos (BUP40NIC1; BUP40NIC0.5, BUP10NIC1 Y BUP10NIC0.5) o suero fisiológico (VEH-VEH). El procedimiento aplicado fue el mismo que el descrito en el experimento anterior.

2. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos han sido analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las medidas registradas y analizadas fueron las mismas que en el Experimento 3. Las diferencias entre grupos de tratamientos se realizaron posteriormente, mediante el test DHS de Tukey, considerándose significativo a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Análisis conjunto de los adolescentes y los adultos

En relación con el factor Edad, el ANOVA mostró que la interacción del tratamiento agudo con nicotina y bupropión fue estadísticamente significativa en: número de HD $F(1, 167) = 1.63$, $p < 0.004$ y erguirse sin pared $F(17,167) = 25.50$, $p < 0.001$. Las pruebas a posteriori indican que los ratones adultos realizaron menos HD que los adolescentes ($p < 0.01$). En cambio, en la conducta de erguirse sin pared fueron los ratones adultos los que realizaron más veces dicha conducta ($p < 0.001$).

El factor Tratamiento también alcanzó la significación estadística en la latencia al primer HD $F(8,167) = 6.35$, $p < 0.001$. El análisis post-hoc evidenció que el tratamiento BUP40-NIC1 incrementó la latencia de respuesta en comparación con los grupos tratados con BUP40-VEH, VEH-NIC1 o VEH-VEH ($p < 0.001$). El número de HD fue estadísticamente significativo $F(8,167) = 8.93$, $p < 0.001$. Las pruebas a posteriori indican que el tratamiento con BUP40-VEH disminuyó el número de HD en comparación con VEH-VEH ($p < 0.001$). Asimismo, los grupos BUP40-NIC1 y BUP40-NIC0.5 mostraron menos número de HD que VEH-VEH ($p < 0.001$). El ANOVA también indicó diferencias en la conducta de erguir con pared $F(8,167) = 6.64$, ($p < 0.001$). El análisis post hoc mostró que el tratamiento VEH-NIC1 disminuyó la conducta de erguir con pared respecto al VEH-VEH ($p < 0.05$). Por último, el factor Tratamiento también alcanzó la significación estadística cuando se analizó el tiempo dedicado al cuidado corporal $F(8,167) = 3.49$,

$p < 0.001$. Las pruebas a posteriori en dicha conducta no detectaron el origen de estas diferencias.

La interacción Edad y Tratamiento fue estadísticamente significativa en la medida de la latencia al primer HD $F(8,149) = 2.33$, $p < 0.022$ (ver Figura 4.2). El resto de conductas analizadas no alcanzaron la significación estadística. A continuación realizamos un análisis más pormenorizado, diferenciando los datos registrados por los ratones adolescentes y los ratones adultos.

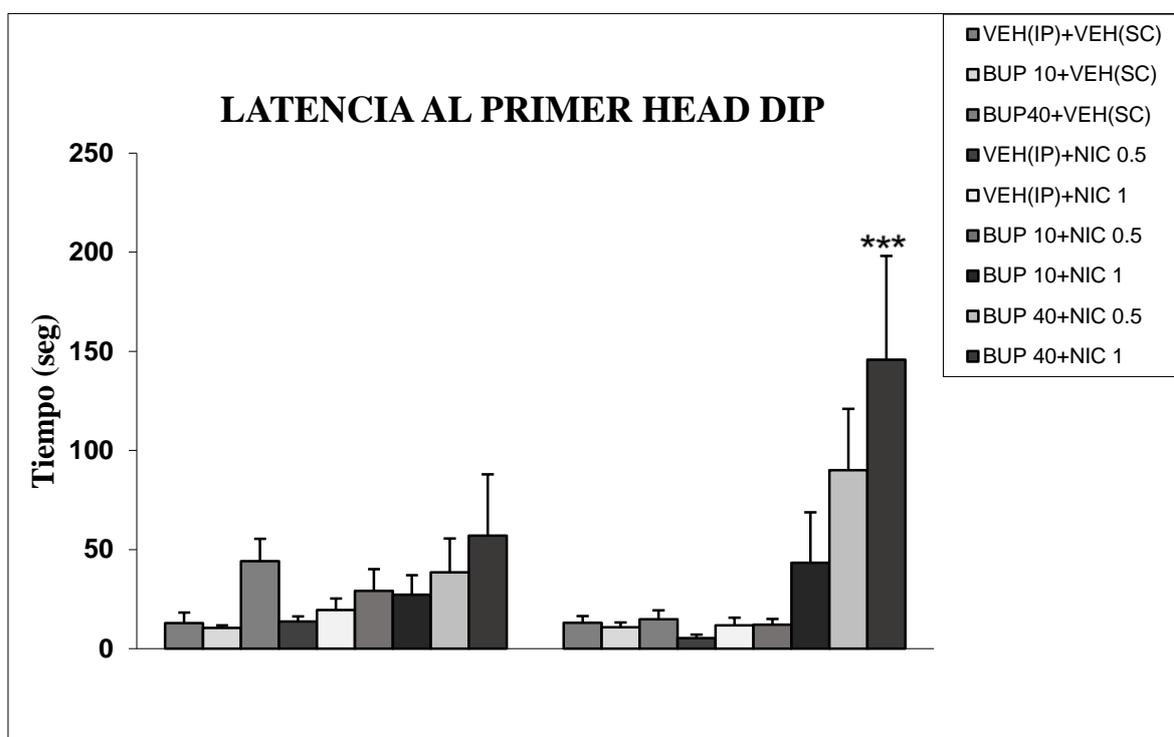


Figura 4.2. Efectos de la administración aguda de nicotina, bupropión, vehículo y su interacción en la latencia al primer head dip en ratones NMRI adolescentes y adultos en el test del hole board.

*** $p < 0.001$, BUP40-NIC1 vs VEH-VEH

Adolescentes

La tabla 4.1 muestra los resultados de la administración aguda del tratamiento con nicotina (0.5 y 1 mg/kg), bupropión (10 y 40 mg/kg), la interacción de ambos fármacos o vehículo en la tabla de agujeros en ratones adolescentes machos NMRI en las siguientes categorías conductuales: total de HD; latencia al primer HD; erguirse con pared, erguirse sin pared; total de erguirse; y cuidado corporal. Los datos se presentan en las medias \pm SEM.

Tabla 4.1. Efecto de la administración aguda del tratamiento con nicotina (1 y 0.5 mg/kg) y bupropión (40 y 10 mg/kg) o vehículo (VEH) en el "Hole-board" con ratones adolescentes macho NMRI. Los datos presentan las medias \pm SEM.

Conductas	VEH-VEH	VEH-NIC0.5	VEH-NIC1	VEH-BUP10	VEH-BUP40	BUP10-NIC0.5	BUP40-NIC0.5	BUP10-NIC1	BUP40-NIC1
Total HD	28,22 \pm 4,17	26,89 \pm 4,39	14,63 \pm 3,67	26 \pm 3,68	9,1 \pm 2,16**	20,5 \pm 4,41	13,9 \pm 5,35	16,8 \pm 2,41	8,4 \pm 2,31**
Latencia	12,89 \pm 5,42	13,67 \pm 2,69	19,5 \pm 5,82	10,5 \pm 1,34	44,2 \pm 11,20	29,2 \pm 10,93	38,6 \pm 17	27,3 \pm 9,78	57 \pm 30,91
Erguir con pared	39,78 \pm 6,30	30,67 \pm 6,13	11,63 \pm 4,31	42,9 \pm 5,05	49,3 \pm 6,74	34 \pm 3,50	47,9 \pm 10,06	29,7 \pm 5,40	47,4 \pm 10,37
Erguir sin pared	15 \pm 2,92	10,67 \pm 2,72	6,63 \pm 4,16	8,7 \pm 1,30	9,1 \pm 1,26	8,6 \pm 1,67	9,7 \pm 1,9	12,8 \pm 3,24	11,6 \pm 2,36
Total erguirse	54,78 \pm 7,85	41,33 \pm 8,41	18,25 \pm 8,01	51,60 \pm 5,85	58,4 \pm 6,93	42,6 \pm 3,28	57,6 \pm 11,28	42,5 \pm 8,09	59 \pm 11,92
Cuidado corporal	1,56 \pm 0,47	2,22 \pm 0,63	3 \pm 0,97	1,7 \pm 0,54	1,3 \pm 0,44	0,8 \pm 0,34	0,6 \pm 0,36+	1,7 \pm 0,41	0,9 \pm 0,37

**p<0.01 BUP40-VEH vs VEH-VEH; BUP40-NIC1 vs VEH-VEH

El ANOVA mostró que la interacción del tratamiento agudo de nicotina y bupropión con ratones adolescentes resultó estadísticamente significativa en el número de HD $F(8,77)=4.50$, $p<0.001$. El análisis de Tukey reveló que el tratamiento con la dosis más alta de bupropión BUP40-VEH y su interacción con nicotina BUP40-NIC1 disminuyó el número de HD en comparación con el vehículo ($p<0.01$). Además los análisis indicaron la existencia de diferencias significativas en la conducta de erguir con pared $F(8,77)=3.10$, $p<0.004$, el total de erguirse $F(8,77)=2.46$, $p<0.02$ y la conducta de cuidado corporal $F(8,77)=2.28$, $p<0.03$, no encontrándose diferencias en las pruebas post-hoc. Respecto a la conducta de latencia al primer HD y erguirse sin pared no se encontraron diferencias significativas.

Adultos

En la tabla 4.2 se presentan los resultados obtenidos en las siguiente categorías conductuales: total de HD; latencia al primer HD; erguirse con pared, erguirse sin pared; el total de erguirse; y cuidado corporal, tras la administración aguda del tratamiento con nicotina (0.5 y 1 mg/kg), (bupropión 10 y 40 mg/kg), la interacción de ambos fármacos o vehículo.

El ANOVA reveló que la interacción del tratamiento agudo de nicotina y bupropión en adultos fue estadísticamente significativa en la latencia al primer HD, $F(8,81)=5.33$, $p<0.001$. El análisis post-hoc de Tukey indicó que el grupo tratado con la dosis más altas de nicotina y bupropión BUP40-NIC1 incrementó la latencia en comparación con el grupo VEH-VEH ($p<0.001$). El número total de HD también resultó significativo $F(8,81)=5.95$, $p<0.001$. Las pruebas a posteriori mostraron que la coadministración de BUP40-NIC0.5 y BUP40-NIC1 disminuyó dicha conducta en comparación con VEH-VEH ($p<0.05$ y $p<0.001$, respectivamente). Así mismo se observa que el tratamiento con bupropión y nicotina influyó significativamente en la conducta de erguirse con pared, $F(8,81)=5.10$, $p<0.001$. El post hoc reveló que los animales tratados con nicotina VEH-NIC1 realizaron menos veces dicha conducta que los que recibieron VEH-VEH ($p<0.05$). Por último, las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas en la conducta de erguirse con pared $F(8,81)=5.502$, $p<0.001$ y cuidado corporal $F(8,81)=2.33$, $p<0.05$. Si bien, las pruebas a posteriori no reflejaron dichas diferencias.

Tabla 4.2. Efecto de la administración aguda del tratamiento con nicotina (1 y 0.5 mg/kg) y bupropión (40 y 10 mg/kg) o vehículo (VEH) en el “Hole-board” con ratones adultos macho NMRI. Los datos presentan las medias \pm SEM.

Conductas	VEH-VEH	VEH-NIC0.5	VEH-NIC1	VEH-BUP10	VEH-BUP40	BUP10-NIC0.5	BUP40-NIC0.5	BUP10-NIC1	BUP40-NIC1
Total HD	20,67 \pm 4,90	24,89 \pm 4,17	16,22 \pm 4,19	11,67 \pm 1,73	8,67 \pm 1,37	16,67 \pm 4,24	5,11 \pm 1,3*	17,44 \pm 3,57	1,56 \pm 0,64***
Latencia	13,00 \pm 3,40	5,33 \pm 1,8	11,78 \pm 3,9	10,89 \pm 2,37	14,89 \pm 4,5	12,11 \pm 2,9	90 \pm 31,3	43,33 \pm 25,8	154,78 \pm 52,9***
Erguir con pared	33,11 \pm 2,82	24,44 \pm 5,30	10,78 \pm 3,34*	48,33 \pm 5,21	48,11 \pm 5,08	45,22 \pm 7,24	36,89 \pm 7,01	37,89 \pm 5,28	28,89 \pm 6,98
Erguir sin pared	22,56 \pm 4,45	15,22 \pm 4,60	9,89 \pm 3,10	23,44 \pm 5,09	18,44 \pm 4,08	25,22 \pm 6,36	17,11 \pm 3,05	16,33 \pm 3,35	14,44 \pm 3,69
Total erguir	55,67 \pm 9,19	39,67 \pm 8,59	20,67 \pm 6,06	71,78 \pm 7,45	66,56 \pm 5,91	70,44 \pm 11,41	54 \pm 8,61	54,22 \pm 7,21	43,33 \pm 7,31
Cuidado corporal	2,22 \pm 0,65	1,44 \pm 0,66	1,67 \pm 0,58	1,33 \pm 0,63	0,44 \pm 0,18	0,78 \pm 0,23	1,33 \pm 0,50	2,11 \pm 0,48	0,11 \pm 0,11

*** p<0.001 BUP40-NIC1 vs VEH-VEH

*p<0.05 BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH; VEH-NIC1 vs VEH-VEH)

4. DISCUSIÓN

El presente estudio se centró en los efectos de la interacción del bupropión y la nicotina, así como en los efectos del tratamiento único con estos fármacos sobre la conducta exploratoria en ratones de diferentes edades. Nuestros resultados muestran cambios específicos con la edad en los niveles de exploración de los estímulos ambientales, ya que los ratones adolescentes mostraron un incremento del número de head dipping, el cual es considerado como un indicador del nivel de curiosidad o búsqueda de novedad. Esta observación confirma estudios previos que describían un aumento de la búsqueda de la novedad y la actividad exploratoria en roedores adolescentes (Carrasco y cols., 2013) y lo hallado también en el anterior estudio de la presente Tesis Doctoral.

Mientras que el tratamiento con bupropión en adultos ha sido ampliamente estudiado, se sabe poco acerca de sus efectos conductuales en la adolescencia, periodo en el que se producen continuos cambios neuronales (Buwalda y cols., 2011; Spear, 2000). Por ejemplo, la adolescencia se ha asociado con alteraciones significativas en el sistema dopaminérgico (ver revisión, Galván, 2010). Las ratas adolescentes pueden ser más sensibles a la inhibición en la recaptación de dopamina que los adultos (Bolanos y cols., 1998), lo que sugiere que durante la adolescencia las experiencias gratificantes provocan una mayor liberación de dopamina al comparar con los cambios observados en animales adultos (Laviola y cols., 2003).

En nuestro estudio la evaluación de los efectos inducidos por el tratamiento agudo con bupropión sobre la conducta del head dipping indica que la dosis más elevada de este fármaco (40mg/kg) produjo cambios en esta tarea exploratoria, mostrando una reducción significativa en el número de HD en ratones adolescentes, sin inducir claros efectos en los adultos. Ello, podría indicar que los efectos del bupropión van a depender del nivel basal de exploración de los animales, es decir, cuando hay niveles altos como en el caso de los adolescentes se hacen más evidentes los efectos del bupropión. La reducción de la actividad exploratoria después de recibir el tratamiento con bupropión sugiere la presencia de alteraciones en el estado emocional de los ratones adolescentes y una disminución en la motivación para explorar un entorno desconocido (Takeda y cols., 1998; Vaglenova y cols., 2004). El hole board es considerado un test que mide cambios en la conducta emocional de los animales cuando se exponen a un nuevo ambiente (Saitoh y cols., 2006). En los roedores, las diferencias en la actividad dopaminérgica mesolímbica

pueden influir en la relación entre reactividad a la novedad y la respuesta a los fármacos (Bardo y cols., 2006).

Otro objetivo fue evaluar los efectos de la coadministración de bupropión y nicotina en la búsqueda de la novedad comparando ratones de diferentes edades, lo que podría ayudar a comprender mejor el perfil conductual del bupropión y de la nicotina así como ayudar al esclarecimiento de sus propiedades farmacológicas. Si bien, hay numerosos estudios indicando que los ratones adolescentes son más sensibles a los efectos adictivos de la nicotina, no todos confirman este efecto diferencial (Shram y cols., 2008). Lo hallado en el presente estudio muestra que el tratamiento agudo con nicotina no indujo efectos significativos en la conducta del head dipping ni se observaron cambios en la latencia al primer head dip en ninguna de las dos edades evaluadas (adolescentes y adultos). Además, nuestros resultados indican que la administración de la dosis más alta de bupropión junto a las dos dosis de nicotina indujeron una disminución del head dipping en ambas edades. En los adolescentes se observa que el tratamiento con la dosis más alta de bupropión y nicotina (BUP40-NIC1) provocó una disminución del HD cuando los animales fueron confrontados a un nuevo entorno, disminuyendo la exploración de forma similar a cuando se administró únicamente bupropión. Un resultado interesante lo encontramos en los ratones adultos, en los que el tratamiento único con bupropión o nicotina no tuvo efectos significativos en la conducta de head dipping. Sin embargo, la interacción entre ambos fármacos indujo una acusada disminución de dicha conducta, sugiriendo que tanto en adolescentes como en adultos la nicotina potencia los efectos del bupropión.

También hemos valorado los cambios que se observan en otras categorías conductuales con el fin de obtener una visión más completa del comportamiento de los ratones después de la administración de nicotina, bupropión o la interacción de ambos tratamientos en el hole board. Investigaciones previas empleando ratas y ratones han encontrado que los adolescentes actúan de forma hiperactiva cuando se encuentran en medios novedosos (Darmani y cols., 1996). Los ratones adolescentes aumentaban la búsqueda de novedad comparado con los adultos y en las ratas adolescentes encontraban que eran hiper-reativas ante los estímulos nuevos (Spear, 2000). Nuestros datos, en cambio, reflejan que los ratones adolescentes disminuyeron la conducta de eruir sin pared en comparación con los adultos, confirmando estudios previos que indican que los

roedores adolescentes presentan una menor exploración motora que los adultos cuando esta se evalúa en el laberinto elevado en forma de cruz (Doresmus y cols., 2003; Lynn y Brown, 2010). Por otra parte, en ratones adultos el tratamiento con nicotina tuvo efectos sobre la conducta de erguirse. Los cambios observados en esta conducta señalan que la administración aguda de nicotina disminuyó la actividad motora de forma dosis-dependiente.

En conclusión, nuestros resultados confirman y amplían estudios previos que sugerían que el bupropión y la interacción de bupropión y nicotina inducen efectos diferentes en función de la edad en que son administrados a los animales.

EXPERIMENTO 5. INTERACCIÓN ENTRE BUPROPIÓN Y NICOTINA: EFECTOS SOBRE LA ANSIEDAD EN RATONES ADOLESCENTES Y ADULTOS

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. Animales

En este experimento se emplearon 190 ratones macho de la cepa NMRI a su llegada al laboratorio tenían 23 días de edad y un peso aproximado de 11-14 gr, obtenidos comercialmente de laboratorios Charles-River (Barcelona, España). Los animales fueron alojados en grupos de cinco, en cajas de plástico opaco de 25 x 25 x 15 cm y mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en el Experimento 1.

1.2. Aparatos

- El laberinto elevado en forma de cruz o plus maze está formado por dos brazos abiertos (30 x 5 x 0,25 cm) y dos cerrados (30 x 5 x 15 cm) fijados en ángulos de 90 grados el uno del otro. El punto donde se juntan los cuatro brazos forma la plataforma central (5 x 5 cm). El suelo del laberinto es de Plexiglás negro y las paredes de los brazos cerrados son de Plexiglás transparente. Los brazos abiertos tienen un pequeño borde de 0,25 cm que proporciona agarre a los animales. Todo el aparato está elevado 45 cm del suelo.

El resto de material fue el mismo que el empleado en los Experimentos 3 y 4.

1.3. Tratamiento farmacológico

Los fármacos utilizados fueron bupropión (Bupropion Hydrochloride) y (-)-nicotina di-(+) tartrato sal que se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El tratamiento y las dosis empleadas fueron las mismas que en el anterior Experimento.

1.4. Procedimiento

El periodo de adaptación fue igual a la del Experimento 4. Del total de los 190 ratones la mitad eran adolescentes y los otros 95 adultos.

La valoración en el plus maze se realizó de la siguiente manera. Al principio de cada test, se colocaba al ratón en el área central del “plus maze” de cara a un brazo abierto, dejándole explorar durante cinco minutos el aparato. Al término de cada prueba, los animales eran devueltos a sus jaulas y el laberinto se limpiaba y secaba. Las conductas mostradas por los ratones eran grabadas con una cámara (Panasonic NV-DS27EG) y posteriormente analizadas por un observador “ciego” al grupo de tratamiento al que pertenecía cada animal. Se utilizó un método computerizado para evaluar las conductas mostradas por el animal.

La utilización del programa “Ratón-time” permite establecer el tiempo y frecuencia que pasa el animal en cada una de las tres secciones del aparato (brazos cerrados, brazos abiertos y plataforma central). El observador visualiza en la televisión el test previamente grabado, al tiempo que presiona en el teclado del ordenador la tecla que corresponde a la conducta que el animal realiza. Las medidas grabadas durante el periodo del test son la frecuencia de entradas y el porcentaje de tiempo empleado por el animal en cada sección del aparato. Se consideraba que un brazo era visitado cuando el animal entraba con las cuatro patas (Pellow y cols., 1985). Finalizada la valoración, se obtuvo un registro impreso de los resultados. Además, se realizó un análisis etológico de las siguientes conductas (Rodgers y cols., 1994):

- “*Head dipping*” (HD) consiste en un movimiento de cabeza exploratorio. Será considerada esta conducta cada vez que el animal saque la cabeza hacia el suelo, tanto en la sección abierta como en la cerrada y el número total de veces que la muestra. La sección cerrada o área protegida comprende los brazos cerrados y la plataforma central y los brazos abiertos son la sección abierta o no protegida.
- “*Stretched attend posture*” (SAP) es una postura exploratoria, en la que el animal estira la cabeza y el cuerpo hacia delante, retrayéndose a su posición original en brazos abiertos y cerrados. También se distingue si se realiza en el área protegida o no protegida.
- “*Rearing*” o erguirse cuando el animal se levanta sobre sus patas traseras, apoyándose en la pared del brazo cerrado.

La literatura acerca de la relación entre las conductas analizadas y la ansiedad indican que el aumento o disminución en el número y porcentaje de entradas en los brazos

abiertos, así como el tiempo empleado en los brazos abiertos son utilizados como parámetros para medir los efectos ansiolíticos o ansiógenos de los diferentes fármacos (Modol y cols., 2011; Navarro y cols., 2002).

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos han sido analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las conductas analizadas fueron:

1. Frecuencia de entradas en cada sección del aparato.
2. Porcentaje de tiempo empleado (en segundos) por el animal en cada sección del aparato.
3. Frecuencia de HD, número de veces que el animal saca la cabeza hacia el suelo).
4. Porcentaje de HD que el animal realiza en la sección protegida del aparato.
5. Frecuencia de SAP (número de veces que el animal estira la cabeza y el cuerpo hacia delante, retrayéndose a su posición original).
6. Porcentaje de SAP que el animal realiza en la sección protegida del aparato.
7. Frecuencia de erguirse (número de veces que el animal se levanta sobre sus patas traseras, apoyándose en pared del brazo cerrado).

El análisis de diferencias entre grupos de tratamientos se realizaron mediante el test DHS de tukey, considerando estadísticamente significativo a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Análisis conjunto de los adolescentes y los adultos

El análisis de varianza mostró que el factor Edad fue estadísticamente significativo en las siguientes variables: entradas en brazos abiertos $F(8,162) = 9,2$, $p < 0,003$; entradas plataforma central $F(8,162) = 11,2$, $p < 0,001$; entradas total a brazos $F(8,162) = 10,3$, $p < 0,002$; SAP en brazos abiertos $F(8,162) = 5,9$, $p < 0,02$; porcentaje de HD $F(8,162) = 10,8$, $p < 0,001$; erguirse $F(8,162) = 4,3$, $p < 0,04$. Las pruebas a posteriori señalaron que los ratones adolescentes, en comparación con los adultos, ejecutaron más entradas a los brazos abiertos ($p < 0,01$), entradas a la plataforma central ($p < 0,01$), entradas totales a brazos ($p < 0,01$), SAP en los brazos abiertos ($p < 0,05$) y erguirse ($p < 0,05$). En

cambio, dichos post-hoc mostraron que el porcentaje de HD de los ratones adolescentes disminuyó en comparación con los adultos ($p < 0.01$).

El factor Tratamiento fue estadísticamente significativo respecto a la frecuencia en la que los ratones adolescentes y adultos realizaron las siguientes conductas: entradas a los brazos abiertos $F(8,162) = 4.2$, $p < 0.001$; entrada a los brazos cerrados $F(8,162) = 3.9$, $p < 0.001$; entradas a la plataforma central $F(8,162) = 7.0$, $p < 0.001$; entradas totales a los brazos $F(8,162) = 6.7$, $p < 0.001$. Los análisis post-hoc no detectaron el origen de dichas diferencias.

El ANOVA mostró además que la interacción del tratamiento agudo con nicotina y bupropión influyó significativamente en la frecuencia en la que los ratones adolescentes y adultos realizaron HD en los brazos cerrados $F(8,162) = 5.03$, $p < 0.001$. El post-hoc evidenció que la interacción BUP40-NIC0.5 disminuyó el número de HD en los brazos protegidos en comparación con el VEH-VEH ($p < 0.01$). El SAP en los brazos abiertos resultó estadísticamente significativo $F(8,162) = 4.1$, $p < 0.001$. Las pruebas a posteriori evidenciaron que los ratones que recibieron la dosis más alta de nicotina VEH-NIC1 realizaron menos veces dicha conducta al compararlos con VEH-VEH ($p < 0.05$). También se detectaron diferencias significativas en el total de SAP $F(8,162) = 4.5$, $p < 0.001$, siendo los animales tratados con la dosis de VEH-NIC1 los que disminuyeron el número total de SAP en comparación con VEH-VEH ($p < 0.05$). Así mismo, resultaron estadísticamente significativas las diferencias en la conducta de erguirse $F(8,162) = 2.5$, $p < 0.01$, observándose que la dosis más alta de nicotina (1mg/kg) redujo dicha conducta en comparación con VEH-VEH ($p < 0.01$). Respecto al resto de conductas no se registraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Por otra parte, el ANOVA también evidenció que los factores principales Edad y Dosis interaccionaron de forma significativa en las siguientes variables: tiempo en brazos abiertos $F(8,162) = 2.1$, $p < 0.04$; frecuencia de HD en los brazos cerrados $F(8,162) = 2.7$, $p < 0.008$ y porcentaje del total de HD $F(8,162) = 2.6$, $p < 0.01$. Con el fin de profundizar en dichas diferencias se realizaron análisis separados para los grupos de ratones adolescentes y adultos, que se exponen a continuación.

Adolescentes

La Tabla 5.1 muestra los datos (media \pm SEM) de cada una de las categorías conductuales de todos los grupos experimentales.

Tabla 5.1. Efecto de la administración aguda del tratamiento con nicotina (1 y 0.5 mg/kg) y bupropión (40 y 10 mg/kg) o vehículo (VEH) en el plus-maze con ratones adolescente machos NMRI. Los datos presentan las medias \pm SEM.

	VEH-VEH	VEH-NIC0.5	VEH-NIC1	BUP10-VEH	BUP40-VEH	BUP10-NIC0.5	BUP40-NIC0.5	BUP10-NIC1	BUP40-NIC1
Total de entradas	22,4 \pm 2,5	17,33 \pm 3,3	12,33 \pm 3*	24,20 \pm 3,5	29,20 \pm 3,6	22,90 \pm 3,5	37,20 \pm 2,7**	28,89 \pm 2,6	30,13 \pm 7,1
Tiempo brazos abiertos	129 \pm 15,6	118,4 \pm 30,3	197 \pm 25*	116,5 \pm 14,1	131 \pm 20	147,4 \pm 20,6	105,4 \pm 19,6	147,8 \pm 11,5	184,2 \pm 29
Entradas brazos abiertos	10,30 \pm 1,0	8,67 \pm 1,9	6,78 \pm 1,4	12,20 \pm 2,2	15,80 \pm 2,8	12,40 \pm 1,6	16,50 \pm 2,2*	16,22 \pm 3,3	18,13 \pm 3,5**
Entradas brazos cerrados	12,10 \pm 1,8	8,67 \pm 1,8	5,56 \pm 1,7*	12 \pm 2,5	13,40 \pm 4,5	10,50 \pm 2,2	20,70 \pm 2,8**	12,67 \pm 1,3	12 \pm 4,6
Entrada plataforma central	21,1 \pm 1,9	16,6 \pm 3,1	12,2 \pm 3	24,1 \pm 3,6	29,3 \pm 3,5	22,3 \pm 3,6	37,4 \pm 2,6***	29 \pm 2,8	29,6 \pm 6,8
% Total HD	24,5 \pm 4,1	39,38 \pm 11,8*	15,93 \pm 4,9	32,1 \pm 2,7	20,93 \pm 6	17,49 \pm 3,8	11,5 \pm 4,1	23 \pm 2,6	16,3 \pm 2,2
HD brazo protegido	9,1 \pm 1,6	13 \pm 3	4,56 \pm 1,5*	10,3 \pm 1,2	5,9 \pm 1,4	5,5 \pm 1,2	3,2 \pm 0,8**	7,22 \pm 0,8	5 \pm 1,3
Total SAP	18,20 \pm 2,1	13,78 \pm 2,7	10,78 \pm 2,3*	21,90 \pm 1,5	17,90 \pm 3,1	17,40 \pm 2,9	16,80 \pm 1,8	20,11 \pm 2,7	19 \pm 1,4
Total Rearing	22,20 \pm 3,8	19,67 \pm 2,4	5 \pm 1,5	13,80 \pm 3,3	20,70 \pm 6,8	17,70 \pm 4,2	18,20 \pm 4,3	18,78 \pm 3,6	17,50 \pm 5,6

* p<0.05 VEH-NIC1 vs VEH-VEH, BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH, VEH-NIC1 vs VEH-VEH, VEH-NIC0.5 vs VEH-VEH

**p<0.01 BUP40-NIC1 vs VEH-VEH, BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH

***p<0.001 BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH

La interacción del tratamiento con nicotina y bupropión resultó estadísticamente significativa en el tiempo en los brazos abiertos, $F(8,84)=2.28$, $p<0.03$. La prueba de Tukey indicó que los ratones tratados con VEH-NIC1 aumentaron esta conducta en comparación VEH-VEH ($p<0.05$). También fueron significativas las diferencias en las entradas en los brazos abiertos $F(8,84)=3.12$, $p<0.004$. El análisis a posteriori evidenció que la interacción con la dosis más alta de bupropión y las dos dosis de nicotina (BUP40-NIC0.5 y BUP40-NIC1) incrementaron el número de entradas en los brazos abiertos respecto al VEH-VEH ($p<0.05$ y $p<0.01$, respectivamente). Igualmente, existieron diferencias significativas en las entradas en los brazos cerrados $F(8,84)=3.36$, $p<0.002$. El tratamiento con la dosis más alta de nicotina VEH-NIC1 disminuyó el número de entradas en los brazos cerrados respecto a los tratados con VEH-VEH ($p<0.05$). En cambio, la coadministración de BUP40-NIC0.5 incrementó significativamente en el número de entradas en los brazos cerrados respecto a los tratados con VEH-VEH ($p<0.01$). Asimismo, se observa que las entradas en la plataforma central fueron significativas $F(8,84)=5.22$, $p<0,001$. Los análisis a posteriori hallaron que la coadministración de BUP40-NIC0.5 aumentó significativamente dicha conducta respecto al VEH-VEH ($p<0.001$).

Por otro lado, también resultaron estadísticamente significativas las diferencias en las entradas totales a los brazos $F(8,84)=4.704$, $p<0.001$. La administración de VEH-NIC1 disminuyó significativamente esta conducta en comparación con el VEH-VEH ($p<0.05$), mientras que la interacción de BUP40-NIC0.5 las aumentó respecto al VEH-VEH ($p<0.01$). Por otro lado, la conducta de HD en los brazos protegidos fue sensible a los efectos del tratamiento experimental $F(8,84)=4.569$, $p<0.001$. Los ratones que recibieron VEH-NIC1 y la interacción BUP40-NIC0.5 presentaron una disminución significativa del número de HD realizados en los brazos protegidos del laberinto respecto a los animales tratados con VEH-VEH ($p<0.05$ y $p<0.01$, respectivamente).

Por último, las diferencias entre los grupos en el porcentaje de HD fueron estadísticamente significativos $F(8,84)=2.794$, $p<0.009$, observándose que el tratamiento VEH-NIC0.5 aumentó significativamente dicha conducta en comparación con aquellos que recibieron VEH-VEH ($p<0.05$). Del mismo modo, la conducta total de SAP fue estadísticamente significativa $F(8,84)=2.087$, $p<0.047$. El tratamiento con la dosis más alta de nicotina (1mg/kg) redujo el número total de SAP respecto al VEH-VEH ($p<0.05$).

También resultó significativo el SAP en los brazos abiertos $F(8,84)=2.44$, $p<0.02$, si bien los análisis post-hoc no detectaron estas diferencias.

Adultos

La Tabla 5.2 muestra los datos (media \pm SEM) para cada una de las categorías conductuales de todos los grupos experimentales.

En los ratones adultos, el análisis de varianza detectó que la interacción del tratamiento con nicotina y bupropión resultó estadísticamente significativa en las entradas en los brazos cerrados $F(8,77)=2.603$, $p<0.02$ y los SAP realizados en los brazos abiertos $F(8,77)=2.089$, $p<0.05$. Si bien, las pruebas a posteriori no hallaron el origen de tales diferencias entre tratamientos.

Las diferencias entre dosis en las entradas en la plataforma central resultaron estadísticamente significativas, $F(8,77)=3.688$, $p<0.001$. Tras realizar el análisis post-hoc del test DHS de Tukey encontramos que los ratones que recibieron el tratamiento VEH-NIC0.5 disminuyeron el número de entradas en la plataforma central respecto al grupo VEH-VEH ($p<0.05$). Asimismo, se observa que fueron significativas las diferencias en las entradas totales en los brazos, $F(8,77)=3.833$, $p<0.001$. Los análisis a posteriori indicaron que el tratamiento con VEH-NIC0.5 y con VEH-NIC1 redujo significativamente dicha conducta en comparación con VEH-VEH ($p<0.05$).

En referencia al número total de SAP, el ANOVA resultó estadísticamente significativo, $F(8,77)=2.742$, $p<0.011$. Los grupos VEH-NIC0.5 y VEH-NIC1 disminuyeron dicha conducta en comparación con el VEH-VEH ($p<0.05$ y $p<0.01$, respectivamente). También la conducta de HD en los brazos protegidos resultó estadísticamente significativo, $F(8,77)=3.314$, $p<0.003$. Los ratones tratados con la dosis más alta de bupropión disminuyeron dicha conducta en comparación con VEH-VEH ($p<0.05$). Del mismo modo, la coadministración BUP40-NIC0.5 y BUP40-NIC1 también disminuyó el HD en los brazos protegidos que los que recibieron VEH-VEH ($p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente). Respecto a la conducta de erguirse se hallaron diferencias significativas $F(8,77)=2.191$, $p<0.039$. El post-hoc indicó que los ratones que recibieron la dosis de BUP10-VEH disminuyeron dicha conducta respecto al grupo VEH-VEH ($p<0.05$). Así mismo, redujo esta conducta el tratamiento con nicotina VEH-NIC0.5 y VEH-NIC1 en comparación con el grupo control VEH-VEH ($p<0.05$ y $p<0.01$, respectivamente), al igual que se observó con la coadministración BUP40-NIC0.5 que disminuyó la conducta de erguirse en comparación con VEH-VEH ($p<0.05$).

Tabla 5.2. Efecto de la administración aguda del tratamiento con nicotina (1 y 0.5 mg/kg) y bupropión (40 y 10 mg/kg) o vehículo (VEH) en el plus maze con ratones adultos machos NMRI. Los datos presentan las medias \pm SEM.

	VEH-VEH	VEH-NIC0.5	VEH-NIC1	BUP10-VEH	BUP40-VEH	BUP10-NIC0.5	BUP40-NIC0.5	BUP10-NIC1	BUP40-NIC1
Total de entradas	20 \pm 0,9	11,89 \pm 2,5*	12,11 \pm 0,9*	20,67 \pm 2,2	27 \pm 1,9	24,67 \pm 1,9	19 \pm 5,5	24,5 \pm 2,4	22 \pm 4,0
Tiempo en brazos abiertos	117,5 \pm 8	149 \pm 31	82 \pm 23	14,4 \pm 15,9	129,8 \pm 21,1	98 \pm 20,3	128 \pm 43,4	133,7 \pm 24,3	143,7 \pm 32,7
Entradas brazos abiertos	9,63 \pm 1,0	6,22 \pm 1,2	5,67 \pm 1,8	12,11 \pm 1,5	12,67 \pm 1,8	10,78 \pm 2,4	9,13 \pm 3,6	13,13 \pm 2,2	10,67 \pm 2,6
Entradas brazos cerrados	10,38 \pm 1,0	5,67 \pm 1,5	6,44 \pm 1,4	8,56 \pm 1,4	14,33 \pm 2,4*	13,89 \pm 1,7	9,88 \pm 2,6	11,38 \pm 2,1	11,33 \pm 2,9
Entradas plataforma central	19,38 \pm 0,9	11,56 \pm 2,5*	12 \pm 2,7	20 \pm 2	26,3 \pm 1,8	22,4 \pm 2	18,5 \pm 5,7	23,7 \pm 2,3	21,9 \pm 4
% Total de HD	39,17 \pm 2,7	49,68 \pm 10,3	27,47 \pm 7,6	46,81 \pm 5,3	43,29 \pm 5,9	32,71 \pm 6,8	42,70 \pm 13,4	44,58 \pm 7,9	47,91 \pm 11,6
HD brazo protegido	10,5 \pm 2,2	8,6 \pm 2,7	13,3 \pm 2,8	10,2 \pm 1,2	4,9 \pm 1,1*	10,8 \pm 1,9	3,7 \pm 1,2**	9 \pm 1	5 \pm 1,4*
% Total HD	30,18 \pm 6,8	26,2 \pm 7,7*	55,2 \pm 9,6	32,2 \pm 5,4	21,8 \pm 8,2	42 \pm 7,9	33,3 \pm 13,7	34,4 \pm 11,2	21,97 \pm 9,5
Total SAP	16,63 \pm 1,3	9,67 \pm 1,3*	8,33 \pm 1,5**	16,89 \pm 2,1	14,22 \pm 3,1	15,56 \pm 2,4	15,75 \pm 2,6	19,88 \pm 2,5	15,78 \pm 3,2
Total Rearing	19,63 \pm 3,2	9,44 \pm 3,0*	7,33 \pm 2,3**	10,11 \pm 1,9*	13 \pm 3,2	18,44 \pm 4	9,63 \pm 3,6*	15,75 \pm 2,8	15,44 \pm 3,4

*p<0.05 VEH-NIC0.5 vs VEH-VEH, VEH-NIC1 vs VEH-VEH, BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH, BUP40-NIC1 vs VEH-VEH, BUP10-VEH vs VEH-VEH, BUP40-VEH vs VEH-VEH

**p<0.01 VEH-NIC1 vs VEH-VEH, BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio evaluamos los efectos del tratamiento con bupropión, nicotina y la interacción entre ambos fármacos sobre la ansiedad en ratones adolescentes y adultos. Para ello, utilizamos el laberinto elevado en forma de cruz que es un test sensible a manipulaciones farmacológicas o conductuales que pueden influir sobre los niveles de ansiedad. Este modelo se basa en el miedo a los espacios abiertos ya que la conducta de ansiedad es normal en roedores cuando se enfrentan a un nuevo entorno, resultando la exposición al ambiente novedoso aversivo por el riesgo de depredación (Livtin y cols., 2008). De hecho en el laberinto elevado en forma de cruz, el incremento del tiempo que los roedores pasan en los brazos abiertos se atribuye a una respuesta asociada a baja ansiedad (Walf y Frye, 2007).

Un dato interesante hallado en el presente experimento es que existen diferencias significativas entre los ratones de diferentes edades, observándose en los ratones adolescentes un aumento de las entradas a brazos abiertos en comparación con los adultos. Este resultado sugiere que los roedores adolescentes exploran más y son menos ansiosos que los adultos (Philpot y Wecker, 2008) y parecen realizar más respuestas arriesgadas y responden más a la novedad que los adultos (Spear, 2007). Este resultado coincide con los dos estudios anteriores recogidos en la presente Tesis Doctoral que también indicaban que los adolescentes mostraban un aumento en la búsqueda de la novedad en el modelo de la tabla de agujeros.

Estudios previos indican que la nicotina ejerce diferentes acciones en conductas relacionadas con la ansiedad, pudiendo actuar como ansiógeno, ansiolítico o no tener efecto (Zarrindast y cols., 2013). Los efectos de la nicotina en la ansiedad resultan complejos al involucrar a varios sistemas de neurotransmisión y sustratos neuroanatómicos. La nicotina modula la liberación de múltiples neurotransmisores en el SNC, incluyendo acetilcolina, noradrenalina, dopamina, GABA, serotonina, glutamato y neuropéptidos. Algunos estudios indican que los comportamientos ansiogénicos inducidos por la nicotina pueden ser resultado de sus efectos sobre péptidos opioides endógenos (Trigo y cols., 2009) o sobre de la liberación de serotonina (Cheeta y cols., 2000) ya que la nicotina altera el nivel de serotonina en regiones como la amígdala, núcleo paraventricular del tálamo e hipocampo dorsal, regiones todas ellas involucradas en los procesos relacionados con la ansiedad (Bang y Commons, 2011).

Algunas investigaciones previas han hallado que la nicotina puede inducir efectos ansiogénicos en el laberinto elevado en forma de cruz (Zarrindast y cols., 2010), mientras otras han sugerido que la nicotina induce efectos de tipo ansiolítico en el test de luz/oscuridad (Piri 2012). Estudios con roedores de diferentes edades apoyan la idea de que los adolescentes son más sensibles a los efectos de la nicotina que los adultos (Ahsan y cols., 2014), lo que indicaría que los efectos de la nicotina podrían verse alterados por la edad de los animales experimentales. Los datos obtenidos en el presente trabajo señalan que la dosis más alta de nicotina indujo un efecto ansiolítico en los adolescentes, mientras que no tuvo efectos en los ratones adultos, confirmado observaciones previas.

Con respecto a los parámetros clásicos utilizados para medir el perfil ansiolítico de un fármaco en el laberinto en cruz, en nuestro estudio encontramos que el tratamiento con bupropión no aumentó el número de entradas a brazos abiertos, el tiempo pasado en los brazos abiertos, o el porcentaje de entradas en los brazos abiertos en ninguna de las dos edades evaluadas. La observación de que el bupropión no parece tener una clara actividad ansiolítica es consistente con trabajos previos realizados en nuestro laboratorio utilizando tanto el test del laberinto elevado en forma de cruz como el paradigma de interacción social (Carrasco y cols., 2006; Redolat y cols., 2005).

Por otra parte, la co-administración de bupropión (40 mg/kg) con las dos dosis de nicotina (0.5 y 1 mg/kg) en los ratones adolescentes indujo un aumento de las entradas en brazos abiertos que ha sido considerada como una medida del efecto ansiolítico (Rodgers y cols., 1994). Por ello, teniendo en cuenta este parámetro, los presentes hallazgos sugieren que la coadministración de estos fármacos parecen inducir un perfil ansiolítico. Estudios previos habían sugerido que el bupropión y sus metabolitos invierten los efectos asociados a la ansiedad tras la abstinencia de nicotina en ratones de 8-10 semanas de edad (Damaj y cols., 2010). Biala y Kruk (2009) también informaron de que el pretratamiento con bupropión invertía el efecto ansiolítico que induce la nicotina y la d-anfetamina en ratones (Biala y Kruk, 2009). En el test del marble-burying, un modelo animal utilizado para examinar los efectos de las drogas en la ansiedad, el bupropión redujo dicha conducta sugiriendo una acción ansiolítica (Hayashi y cols., 2010). Sin embargo, en la prueba de interacción social el bupropión no influyó significativamente en el tiempo que los ratones adultos dedicaron a la investigación social, un parámetro que se ha relacionado con un perfil ansiolítico (Redolat y cols., 2005). Las diferencias metodológicas entre

experimentos - tales como la edad de los sujetos, la manipulación previa a la prueba, el alojamiento, la línea basal del nivel de ansiedad, el procedimiento aplicado o el paradigma de ansiedad empleado en cada estudio- podrían explicar algunos de los resultados contradictorios.

Otra conducta registrada en esta investigación fue la referida a las entradas totales a brazos, medida que se relaciona principalmente con la actividad motora de los animales (Carrasco y cols., 2013) aunque este parámetro puede reflejar ambos efectos (cambios en la ansiedad/o actividad motora). Generalmente, las medidas más habituales para valorar la actividad motora corresponden a las entradas en los brazos cerrados y en la plataforma central (Budzynska y cols., 2015). Los datos previos obtenidos en nuestro laboratorio señalan que la administración de bupropión induce hiperactividad tanto en adolescentes como en adultos (Redolat y cols., 2005). Los resultados del presente estudio indican que, independientemente de la edad, los ratones tratados únicamente con bupropión no mostraron efectos significativos en la actividad motora al no inducir cambios en el número de las entradas a plataforma central y en los brazos cerrados, si bien, en esta última conducta cuando se administro junto con la dosis más baja de nicotina BUP40-NIC 0,5 indujo un incremento en la locomoción pero solo en adolescentes. En cambio, tras la administración de nicotina se advirtió una disminución en la actividad motora en adolescentes y adultos. En el análisis comparativo entre ambos grupos de edad encontramos que la interacción de nicotina y bupropión (BUP40-NIC0.5) incrementó el número de entradas totales a brazos y entradas a brazos cerrados en los ratones adolescentes pero no en los adultos, pudiéndose interpretar como que los adolescentes son más impulsivos que los adultos (Chase y Hogarth, 2011).

El parámetro denominado “stretched attend posture” (SAP) se ha asociado a la conducta exploratoria en el laberinto elevado en forma de cruz y su incremento o disminución se asocia a la indecisión o la exploración (Calatayud y cols., 2004). Nuestros resultados indican que la dosis más alta de nicotina (1mg/kg) disminuyó el número de SAPs totales y el SAP en brazos abiertos, siendo un perfil etológico coherente con una reducción de la búsqueda de la novedad (Abreu-Villaça, 2015). Respecto al parámetro “HD en brazo protegido”, el tratamiento con la dosis más alta de bupropión y su interacción con las dos dosis de nicotina administradas indujeron una disminución de dicha conducta que también se asocia a una disminución en la búsqueda de la novedad, confirmado lo encontrado en el anterior experimento del presente trabajo.

La conducta de erguirse se relaciona con cambios en la actividad motora. En esta investigación hallamos que los ratones adolescentes se irguieron más veces que los adultos. Nuestros resultados también demuestran que cuando el bupropión se administró solo, únicamente la dosis más baja (BUP10) indujo una disminución en la conducta de erguirse en los ratones adultos, sin afectar a otras medidas etológicas obtenidas en el laberinto en cruz. El tratamiento con ambas dosis de nicotina (0.5 y 1 mg/kg) y la coadministración de BUP40-NIC0.5 también redujeron significativamente dicha conducta, lo que probablemente se deba a un mayor efecto hipolocomotor de ambos fármacos en los ratones adultos. Estos datos se relacionan con bajos niveles de exploración pero también con el nivel basal de actividad motora asociada al tratamiento y a los efectos ansiógenos experimentados por los ratones adultos.

En resumen, el presente estudio sugiere que el tratamiento con nicotina y la interacción de bupropión y nicotina muestran efectos diferenciales en las conductas asociadas a la ansiedad en relación con la edad.

ESTUDIO 3

INFLUENCIA DEL BUPROPIÓN SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL

A pesar de los numerosos estudios existentes acerca de la conducta social en ratones, se han realizado pocas investigaciones que aborden y cuantifiquen el efecto que el tratamiento con nicotina y bupropión produce en las conductas etológicas relacionadas con la agresión, y en particular, las posibles diferencias entre adolescentes y adultos.

La agresividad mostrada por los roedores tras manipulaciones farmacológicas ha resultado ser un método útil para comprender los efectos de los fármacos en la conducta. El tratamiento con antidepresivos disminuye la agresión en diferentes modelos animales, de hecho los tratamientos que incrementan el nivel de serotonina reducen las conductas agresivas (Carrillo y cols., 2009). Godar y colaboradores (2014) encontraron que el tratamiento con fluoxetina (ISRS) en ratones agrupados tenía un efecto anti-agresivo cuando se evaluaba tanto en el test de interacción social como en el test intruso-residente. Otros estudios en los que se han manipulado farmacológicamente los niveles de dopamina han encontrado resultados contradictorios, ya que en unos aumentaba y en otros disminuían la agresión (Schwartz y Melloni, 2010).

El paradigma de agresión inducida por aislamiento ha sido ampliamente utilizado en psicofarmacología de la agresión. Este método permite reproducir conductas agresivas típicas de la especie, adaptativas y dirigidas a competir por un territorio, ya que el aislamiento social normalmente incita a la agresión en animales territoriales como los ratones (Brain, 1975). Además, la aplicación de esta metodología permite observar un amplio repertorio de conductas agonísticas, mostradas por los animales cuando son enfrentados a otros machos de la misma especie, haciendo posible el uso de técnicas etológicas que pueden detectar efectos muy específicos de los fármacos que estén siendo evaluados (File y Seth, 2003). Además, hay que tener en cuenta que esta agresión se produce en un área neutral, donde diversos estudios constatan unos niveles de agresión muy inferiores a los observados cuando los encuentros se realizan en la propia jaula del animal (File y Seth, 2003).

Diversos sistemas de neurotransmisión han sido involucrados en la regulación de la conducta agresiva, incluyendo la serotonina, dopamina, GABA, opiáceos (Vanderschuren y Trezza, 2014; Young y cols., 2014), entre otros. Desde el punto de vista neuroanatómico la amígdala es la principal estructura cerebral que procesa el condicionamiento de miedo. En modelos animales de estrés agudo y crónico, las neuronas del núcleo basolateral de la amígdala muestran un incremento en las respuestas que

contribuyen al almacenamiento de la memoria de miedo, incrementando la ansiedad y la agresión (Blanco-Gandia y cols., 2015).

Investigaciones pioneras realizadas con nicotina mostraron que una inyección intraventricular de este fármaco provocaba la estimulación de los receptores colinérgicos nicotínicos y acentuaba el comportamiento agresivo en los ratones, induciendo un aumento en el número de episodios de combate (Rolinski y Herbut, 1985). Posteriormente, Johnson y colaboradores (2003) observaron que la nicotina disminuía tanto las conductas ofensivas (medidas en el paradigma residente-intruso) como defensivas (*target biting*), obteniéndose un efecto más potente en este último caso. En investigaciones previas en nuestro laboratorio encontramos que a dosis bajas de nicotina no se observaba un efecto claro en la agresión inducida por aislamiento en ratones adultos, tanto cuando el fármaco se administraba de forma aguda o de forma crónica durante los 10 días previos a los encuentros agonísticos (Redolat y cols., 2002).

Un aspecto a tener en cuenta en relación con la nicotina es que sus efectos pueden estar modulados por la edad de los animales en el momento de la administración. Numerosos estudios sugieren que los roedores adolescentes y adultos muestran una sensibilidad diferencial a los efectos conductuales, neuroquímicos y endocrinos de esta sustancia (Smith y cols., 2015). Los resultados obtenidos por Smith y colaboradores (2015) revelan que el consumo de nicotina durante la adolescencia temprana produce modificaciones neuronales, alterando el crecimiento dendrítico y afectando especialmente al sistema dopaminérgico.

En general se ha confirmado que los roedores adolescentes son más sensibles a las acciones estimulantes de la nicotina sobre la actividad motora (Cruz y cols., 2005). Asimismo, se ha encontrado que las ratas que han sido pretratadas con nicotina durante la adolescencia muestran una mayor hiperactividad ante ambientes novedosos que los controles (Adriani y cols., 2004). Se han observado diferencias en los efectos reforzantes de la nicotina, siendo la administración de este fármaco más gratificante durante la adolescencia temprana que en edades posteriores (Smith y cols., 2015). Además, en ratones y ratas adolescentes la nicotina induce mayor auto-administración que adultos (Adriani y cols., 2006); aunque en ratas este resultado no fue confirmado por Weaver y colaboradores (2012).

A pesar del número cada vez mayor de trabajos sobre este tema, hay muy pocas investigaciones que hayan abordado el estudio de los efectos diferenciales de la nicotina

en ratones adolescentes y adultos con respecto a la conducta social y la agresión inducida por aislamiento. También, existen pocos estudios acerca de los efectos del tratamiento con bupropión sobre la agresión inducida por aislamiento en ratones. Aplicando este modelo conductual de agresión en nuestro laboratorio, observamos que este fármaco únicamente aumentaba el comportamiento de ataque en ratones que tenían bajos niveles basales de agresividad (Redolat y cols., 2005a).

Con el objetivo de investigar si la administración aguda de nicotina y bupropión o su coadministración influyen sobre la interacción social y el comportamiento agresivo en función de la modalidad de alojamiento, se realizaron tres estudios, los cuales se expondrán a continuación. En el primer estudio se estableció el perfil conductual de la co-administración de nicotina y bupropión durante los encuentros sociales en los ratones alojados en grupo. En el segundo experimento, se evaluó el efecto de ambos fármacos después de un período de aislamiento (15 días) tanto en ratones adolescentes como en adultos. En el último estudio se valoraron los efectos del bupropión en las diferentes categorías conductuales durante los encuentros sociales, atendiendo a las diferentes modalidades de alojamiento

EXPERIMENTO 6. EFECTOS DE LA COADMINISTRACIÓN DE BUPROPIÓN Y NICOTINA SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL ¹

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. Animales

En este experimento se emplearon 250 ratones macho de la cepa OF1, obtenidos de laboratorios Charles-River (Barcelona-España), con un peso aproximado a la llegada al laboratorio de 30-32 gr. Los animales fueron alojados en grupos de cinco ratones en jaulas de plástico opaco (25 x 25 x 15 cm) durante cuatro semanas antes de la evaluación conductual. La mitad de los animales se utilizaron como sujetos experimentales y el resto como oponentes estándar en los test de interacción social.

Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en experimentos anteriores.

1.2. Aparatos

- Caja neutral para encuentros agonísticos: caja de metacrilato transparente (60 x 33 x 30 cm) utilizada para realizar los tests de agresión. También se disponía de un separador de plástico blanco, para mantener separados a los animales durante el minuto de adaptación previo al test. En esta caja de encuentro, antes de introducir al animal, se cubría el suelo con una capa de serrín. Las paredes de la caja se limpiaban, con un líquido que contenía alcohol, después de cada uno de los encuentros agonísticos.
- Ordenador PC con programa “Ratón Time” (Brain y cols., 1989) para la evaluación de las 11 categorías conductuales.

1.3. Fármaco

Los fármacos utilizados fueron bupropión (Bupropion Hydrochloride) y (-)-nicotina di-(+) tartrato sal que se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Ambos fármacos fueron disueltos en suero fisiológico. Una vez disuelta la nicotina en forma de sal con el suero, el pH de la nicotina fue ajustado a 7 con hidróxido

¹ Los resultados de esta investigación han sido publicados en la revista “Addiction Biology”. Gómez, C., Carrasco, C., Redolat, R., 2008. *Effects of bupropion alone or coadministered with nicotine, on social behavior in mice. Addict. Biol.* 13, 301–309.

de sodio (NaOH). Todos los animales recibieron dos tratamientos. En primer lugar, una inyección IP de bupropión o suero fisiológico 30 minutos antes de la realización del test y quince minutos después una segunda inyección SC de nicotina o suero fisiológico. Las dosis de bupropión utilizadas fueron de 10 y 40 mg/kg: (BUP10 y BUP40); y las de nicotina de 0.5 o 1 mg/kg (NIC0.5 y NIC1), así como sus posibles interacciones (BUP40-NIC1 BUP40-NIC0.5 BUP10-NIC1 BUP10-NIC0.5) y suero fisiológico (VEH-VEH). Todas las dosis fueron administradas en inyecciones con un volumen de 10 ml/kg. Las dosis experimentales fueron seleccionados teniendo en cuenta los estudios previos realizados en nuestro laboratorio para medir los efectos de la nicotina y el bupropión en ansiedad y conductas sociales en ratones (Carrasco y cols., 2004) y sus efectos sobre la actividad espontánea en los ratones NMRI adolescentes y adultos (Redolat y cols., 2005).

1.4. Procedimiento

- Técnica de anosmia:

En los encuentros agonísticos, los oponentes estándar eran ratones de edad similar a los ratones experimentales que habían permanecido alojados en grupos de 5 animales, desde su llegada al laboratorio y a los que se anosmió temporalmente. Esta anosmia se realizó anestesiando parcialmente al animal con una pequeña cantidad de éter etílico e introduciéndole en cada orificio nasal 0,025 ml de sulfato de zinc al 4%. Para ello se utilizó una jeringuilla despuntada, y el exceso de líquido fue eliminado frotando la nariz del animal con papel absorbente. A continuación, se cogía al animal por su cola y, mediante movimientos rotatorios, se procedía a su reanimación.

El interés de utilizar oponentes anósmicos radica en el hecho de que estos animales rara vez atacan a los animales experimentales ni inician conductas de investigación social ya que, debido a la anosmia, no reconocen al otro animal como un macho. Sin embargo, sí elicitán ataque por parte del oponente puesto que siguen produciendo feromonas (Brain y Poole, 1974). En un encuentro con un ratón “anósmico” la lucha será siempre unidireccional y fácil de cuantificar (Liebenauer y Slotnock, 1996).

- Test de agresión:

Los test de agresión consistían en encuentros de 10 minutos, durante los cuales un animal experimental (tratado con bupropión, nicotina, bupropión+nicotina o suero fisiológico) era confrontado con un oponente anósmico.

Los tests tuvieron lugar en una caja neutral de plexiglás (60 x 33 x 30 cm). Durante la realización del test la habitación estaba iluminada con una luz blanca de 100 wátios. Previamente al inicio del encuentro agonístico los animales disponían de un minuto de adaptación a la caja mientras permanecían separados por una barrera de plástico opaco blanco. Transcurrido este tiempo, se quitaba la barrera y se iniciaba el test, que era grabado con un equipo de vídeo en el que la cámara estaba montada sobre un trípode frente a la caja de encuentro agonístico.

Con el fin de poder diferenciar durante la grabación al animal experimental del anósmico, a este segundo se le pintó el lomo de color azul con anilina. La latencia de ataque del animal fue medida por el experimentador con un cronómetro digital.

- Evaluación Conductual:

Para evaluar los encuentros agonísticos nos basamos en un procedimiento etológico desarrollado por Brain y colaboradores (1989), que agrupa las conductas mostradas por los animales en 11 categorías conductuales. Una descripción detallada de estas categorías puede encontrarse en Brain y colaboradores (1981). La utilización del programa "Ratón-Time" permite establecer el tiempo que dedica cada animal a las distintas conductas evaluadas. Cada una de las 11 categorías conductuales tiene asignada una tecla determinada. El observador visualiza en la televisión el test de agresión previamente grabado, al tiempo que presiona en el teclado del ordenador la tecla que corresponde a la conducta que el animal realiza. Finalizada la valoración, se obtiene un registro impreso de los resultados.

A continuación se describen los elementos conductuales que se incluyen en cada una de las 11 categorías evaluadas.

1. CUIDADO CORPORAL

- Autoaseo: Lamedura del pelo, en los flancos, el abdomen o el rabo.
- Aseo abreviado: Rápida limpieza de cabeza y nariz con las patas delanteras.
- Rascarse: Se rasca los flancos y la cabeza con las patas traseras.

- Lavado: Se lame las patas delanteras y las pasa repetidamente sobre su cabeza, desde las orejas hasta la nariz.

2. ESCARBAR

- Escarbar: Remueve el serrín hacia atrás con sus patas delanteras.
- Escarbar hacia delante: Remueve el serrín hacia adelante con sus patas delanteras.
- Escarbar hacia atrás: Remueve el serrín hacia atrás con sus patas traseras.

3. EXPLORACIÓN NO SOCIAL

- Exploración: Anda o corre observando el ambiente y no al oponente.
- Ojear: En posición cuadrupedal, el animal dirige su cabeza hacia un lado y otro, su atención no se dirige al oponente.
- Salto: Salta con las cuatro patas.
- Erguirse: En postura bípeda, el animal explora el ambiente en actividad no relacionada con el oponente.
- Erguirse apoyándose en la pared: Como en “erguirse” pero apoyando las patas delanteras en la pared de la jaula.

4. EXPLORACIÓN DESDE UNA DISTANCIA

- Aproximación: Se dirige al oponente.
- Atención: Dirige la atención al oponente desde una distancia, sin moverse.
- Atención extremada: Como en “atención” pero el animal tiene el cuerpo extendido y al cabeza y cuello estirado.
- Circulo: Se acerca y se aleja del oponente sin pausa en la deambulación.
- Cabeza orientada: Gira su cabeza hacia el oponente.

5. EXPLORACIÓN SOCIAL

- Aseo corporal: Lame el cuerpo del oponente, a excepción de la cabeza.
- Aseo de la cabeza: Lame la cabeza del oponente.
- Olfateo corporal: Olfatea el cuerpo y rabo del oponente.
- Olfateo genital: Olfatea el ano y los genitales del oponente.
- Olfateo de la nariz: Olfatea la cabeza y nariz del oponente.
- Seguimiento: El animal persigue al oponente.
- Andar por encima: Apoyando las patas delanteras en el lomo del oponente pasa por encima.
- Andar por debajo: Empujando la cabeza y la parte anterior del cuerpo el animal pasa por debajo del oponente.

- Andando alrededor: Andando alrededor del oponente y con la cabeza dirigida a éste.
- Empujando: Los animales en estrecho contacto lateral se van moviendo en diferentes direcciones.

6. AMENAZA

- Aseo agresivo: Aseo vigoroso del oponente en posición lateral utilizando los dientes y patas delanteras.
- Golpeteo con el rabo: Realiza golpes con el rabo.
- Ofensa lateral: Apoyado en tres patas levanta la más cercana al oponente manteniendo los ojos entreabiertos y las orejas agachadas.
- Ofensa vertical: En postura bipedal con el lomo encorvado y el cuerpo inclinado hacia el oponente manteniendo los ojos entre abiertos y las orejas agachadas.

7. ATAQUE

- Persecución: Corre rápidamente detrás del oponente.
- Carga: Corre rápidamente hacia el oponente.
- Embestida: Arremete contra el oponente, como si fuera a morderle, pero sin hacerlo.
- Ataque: Muerde al oponente.

8. EVITACIÓN / HUIDA

- Alejamiento: Se aleja del oponente.
- Retirada: Corre lejos del oponente cuando éste se aproxima.
- Salto: Salta hacia arriba al acercarse el oponente.
- Girar: Se gira de espaldas al acercarse el oponente.
- Apretado contra la pared: El animal aprieta la superficie ventral del cuerpo contra la pared de la jaula con las patas delanteras extendidas.
- Rebote: Da un salto rápido apoyándose en las paredes de la jaula.
- Retroceso: Retrae la cabeza al acercarse el oponente.
- Sobresalto: Movimiento vertical al acercarse el oponente.

9. DEFENSA / SUMISIÓN

- Defensa lateral: Apoyado en tres patas, levanta la más cercana al oponente manteniendo los ojos abiertos y las orejas extendidas.

- Defensa vertical: En postura bipedal y el cuerpo inclinado hacia el oponente manteniendo los ojos abiertos y las orejas extendidas.
- Sumisión vertical: Como en defensa vertical pero el animal mantiene la cabeza echada hacia atrás y las patas traseras extendidas.

10. INMOVILIDAD

- Agachado: Con las cuatro patas apoyadas en el suelo permanece en total inmovilidad.
- Arrastrarse: En postura similar a la anterior pero el animal se aleja arrastrándose del oponente.

11. CONDUCTA SEXUAL

- Intento de monta: Intenta montar al oponente, pero queda incompleto.
- Monta: Se pone encima del lomo del oponente mientras realiza movimientos pélvicos.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la naturaleza no continua de los datos obtenidos con la valoración etológica, se aplicó la prueba no paramétrica del test de Kruskal-Wallis (Siegel, 1985). Los datos analizados fueron.

1. Tiempo acumulado (en segundos) de cada una de las categorías conductuales.
2. Frecuencia de cada una de las categorías.

Las diferencias entre grupos de tratamientos se analizaron posteriormente en los casos apropiados, mediante el test “U” de Mann-Whitney, considerando la significación estadística a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

La Tabla 6.1 muestra los valores (medianas y rangos del tiempo acumulado en segundos) dedicados a cada una de las categorías conductuales .

El análisis de Kruskal-Wallis encontró diferencias estadísticamente significativas en cuidado corporal ($p < 0.001$). El test U de Mann-Whitney indicó que los grupos BUP40-VEH, BUP40-NIC1 y BUP40-NIC0.5 dedicaron menos tiempo al cuidado corporal que el grupo control VEH-VEH ($p < 0.01$), y que los tratados con las dosis de nicotina VEH-NIC0.5 y VEH-NIC1 ($p < 0.05$). Además, los ratones que recibieron la combinación baja de bupropión y las dos dosis de nicotina BUP10-NIC1, BUP10-NIC0.5 estuvieron menos tiempo realizando la conducta de aseo que los dos grupos que recibieron únicamente nicotina VEH-NIC0.5 y VEH-NIC1 ($p < 0.05$) (ver figura 6.1).

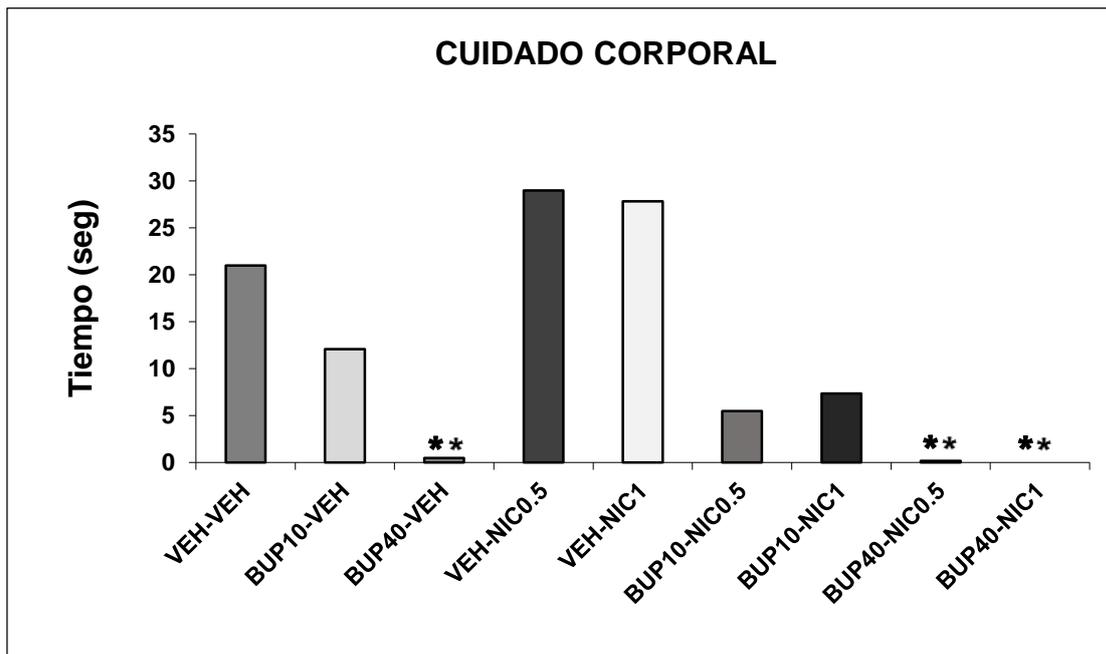


Figura 6.1. Los datos se representan en medianas de la frecuencia dedicada a la conducta de cuidado corporal para cada grupo de tratamiento.

** $p < 0.01$ BUP40-VEH vs VEH-VEH
 BUP40-NIC1 vs VEH-VEH
 BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH

Tabla 6.1. Resultados de la frecuencia en medianas (rango entre paréntesis) que dedican los animales a cada categoría conductual.

	VEH-VEH	VEH-NIC0.5	VEH-NIC1	BUPI0-VEH	BUP40-VEH	BUPI0-NIC0.5	BUP40-NIC0.5	BUPI0-NIC1	BUP40-NIC1
Cuidado corporal^a	23.48 (4.8-62.4)	30.97 (9.1-57.1)	30.45 (2.1-61.1)	19.03 (0-74.1)	0.59** (0-1.8)	12.16 (0.9-43.8)	0.6** (0-5.4)	14.41 (0.3-62.2)	0.22** (0-0.8)
Escarbar^a	18.52 (3.1-75.8)	13.52 (0-32.2)	8.04 (0-17.6)	11.32 (0-21.8)	0.18* (0-1.1)	10.01 (0-37.5)	1.85* (0-17.7)	5.76* (0.2-18)	1.1* (0-11)
Exloración no social^a	380.57 (274.9-428.5)	386.04 (280.4-488.4)	417.69 (374.2-457.3)	405.8 (338.5-456.5)	469.21** (409.6-508.8)	441.33** (397.9-478)	461.8** (325.6-506.4)	404.2 (339.8-453)	454.5** (299.9-515.3)
Exploración a distancia^b	2.21 (0-6)	3.22 (0-12.9)	4.89 (0.3-17.7)	2.81 (0-8.7)	6.87* (1.8-16.9)	3.07* (0.5-12.4)	7.23* (0.8-14.2)	6.33 (0.7-42)	8.27* (1.2-21)
Investigación social	82.5 (50.2-126)	90.6 (21.1-198.9)	59.94 (16.4-112.2)	75.17 (29.9-129.1)	48.83 (14.9-115.2)	59.47 (29.2-105.5)	46.53 (13.2-108.1)	89.87 (23.4-170.1)	63.8 (3-217.4)
Amenaza	3.46 (0-19.6)	0.46 (0-2.3)	1.24 (0-8.1)	0.21 (0-2.1)	0.35 (0-3.5)	0.6 (0-5.6)	1.49 (0-14.5)	0.51 (0-4.7)	1 (0-7.1)
Ataque	14.23 (0-80)	3.14 (0-20)	7.02 (0-55.2)	2.58 (0-25.8)	0.31 (0-3.1)	0.95 (0-9.2)	5.62 (0-56.2)	4.9 (0-34.3)	0.24 (0-1.9)
Evitación/huida	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Defensa/sumisión	0 (0-0)	0.69 (0-6.9)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.47 (0-2.4)	1.07 (0-6.3)	0 (0-0)	6.08 (0-59.3)	0.18 (0-1.8)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	3.36 (0-33.6)	0 (0-0)	0 (0-0)

^aMuestra una varianza significativa en Kruskal-Wallis test p<0.001^bMuestra una varianza significativa en Kruskal-Wallis test p<0.009

** Difiere con el grupo control VEH-VEH p<0.01; * Difiere con el grupo control VEH-VEH p<0.05 en Mann-Whitney 'U'

En la conducta de escarbar se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$). Los ratones tratados con las combinaciones BUP40-VEH, BUP40-NIC1, BUP40-NIC0.5 y BUP10-NIC1 dedicaron menos tiempo a escarbar que el grupo que recibió suero fisiológico VEH-VEH ($p < 0.05$). Los grupos BUP40-NIC1, BUP40-NIC0.5 exhibieron menos veces dicha conducta que los que recibieron únicamente nicotina VEH-NIC0.5 y VEH-NIC1 ($p < 0.05$) (ver figura 6.2).

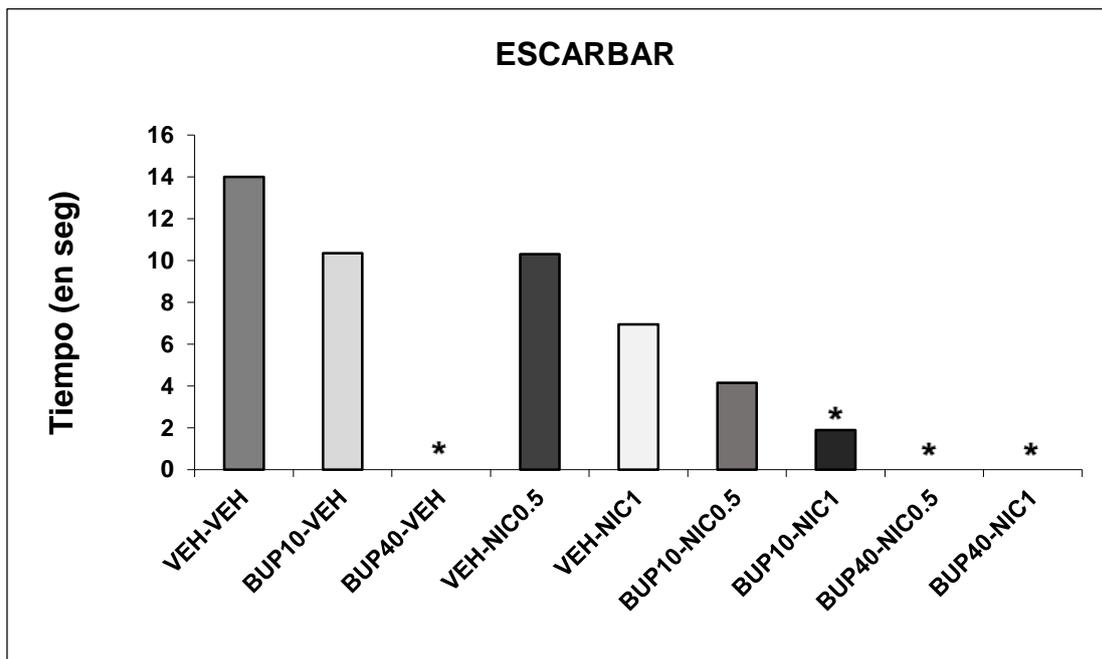


Figura 6.2. Los datos se representan en medianas de la frecuencia dedicada a la conducta de escarbar para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP40-VEH vs VEH-VEH
BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH
BUP40-NIC1 VS VEH-VEH
BUP10-NIC1 vs VEH-VEH

Con respecto al tiempo dedicado a exploración no social se evidenció que las diferencias en el tratamiento experimental resultaron estadísticamente significativas ($p < 0.001$). El análisis a posteriori indicó que los ratones tratados con las combinaciones de BUP40-NIC1, BUP40-NIC0.5 BUP40-VEH y BUP10-NIC0.5 pasaron más tiempo explorando el ambiente que el grupo control VEH-VEH ($p < 0.01$). Los ratones tratados con BUP40-NIC1 permanecieron más tiempo en exploración no social que el VEH-NIC1 ($p < 0.05$). Los grupos BUP40-NIC0.5 y BUP10-NIC0.5 dedicaron más tiempo a esta conducta que VEH-NIC0.5 ($p < 0.05$). Finalmente, el grupo que recibió BUP10-NIC0.5 exploró más el ambiente que BUP10-VEH ($p < 0.05$) (ver figura 6.3).

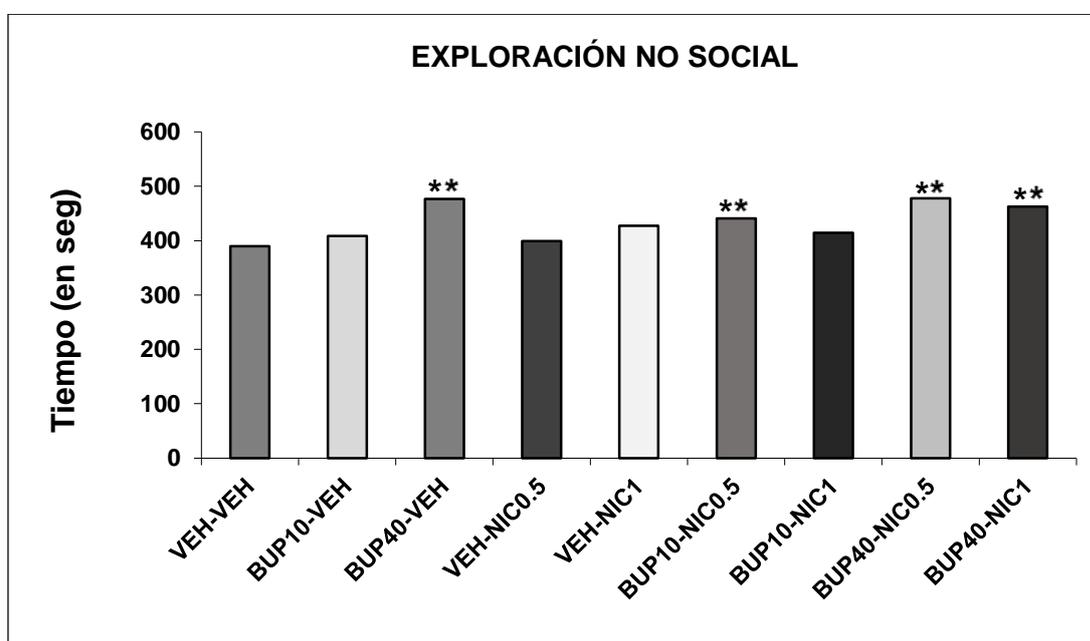


Figura 6.3. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a la conducta de exploración no social para cada grupo de tratamiento.

** $p < 0.01$ BUP40-VEH vs VEH-VEH

BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH

BUP40-NIC1 VS VEH-VEH

BUP10-NIC0.5 vs VEH-VEH

El tratamiento influyó de forma significativa en la conducta de exploración a distancia ($p < 0.01$). Los ratones tratados con BUP40-VEH, BUP40-NIC1, BUP40-NIC0.5 y BUP10-NIC0.5 dedicaron más tiempo a esta categoría que los animales tratados con vehículo ($p < 0.05$). También se observó que los animales del grupo que recibió la combinación de BUP40-NIC0.5 pasaron más tiempo realizando dicha

conducta que el grupo al que se le administro la dosis más baja de nicotina VEH-NIC0.5 ($p < 0.05$) (ver figura 6.4).

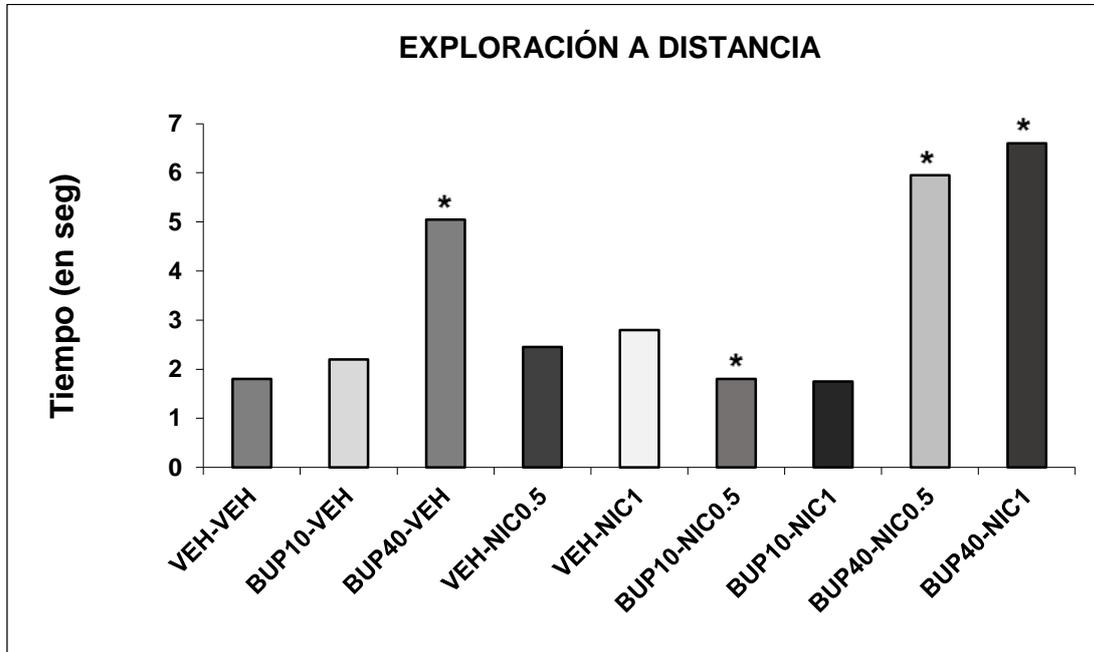


Figura 6.4. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a la conducta de exploración a distancia para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP40-VEH vs VEH-VEH
 BUP40-NIC0.5 vs VEH-VEH
 BUP40-NIC1 VS VEH-VEH
 BUP10-NIC0.5 vs VEH-VEH

El tratamiento agudo con nicotina y bupropión o las combinaciones de estos dos fármacos no influyeron significativamente en el tiempo asignado a la exploración social durante los encuentros agonísticos. Las categorías de amenaza y ataque, relacionadas con las conductas agresivas ofensivas, no fueron significativamente modificadas por ninguno de los tratamientos empleados. Los ratones tratados con nicotina y bupropión, administrado solo o en combinación, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las conductas de escape/evitación y defensa/sumisión en los diferentes grupos. Las medianas en inmovilidad fueron de 0 en todos los grupos y no se encontraron diferencias en el análisis del Kruskal-Wallis.

4. DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta investigación fue explorar en profundidad el perfil de la conducta agonística en ratones tratados con nicotina y bupropión. Con este propósito, a los animales se les administraron una única dosis de bupropión, nicotina, la coadministración de ambos fármacos o solución salina antes de un encuentro social con oponentes.

La conducta de exploración social mostrada por los ratones durante los encuentros agonísticos es una medida empleada con frecuencia para evaluar los efectos de los fármacos sobre la ansiedad (Navarro y cols., 2004; Redolat y cols., 2005). El aumento en la interacción social se interpreta como un perfil ansiolítico y su disminución como ansiogénico (Navarro y cols., 2004; Redolat y cols., 2005). En el presente estudio el análisis etológico indicó que la administración aguda de bupropión no influyó significativamente en el tiempo que los ratones pasaron en interacción social, por lo que no hay una evidencia clara de que el fármaco tenga un efecto ansiolítico. Estos resultados están de acuerdo con investigaciones previas en las que se han empleado ratones alojados individualmente y cuyos resultados indicaban que el bupropión no tenía unos claros efectos ansiolíticos, ya sea en el laberinto elevado en cruz o en la prueba de la interacción social (Redolat y cols., 2005). Además, ni la administración aguda de nicotina ni sus posibles combinaciones con bupropión indujeron cambios significativos en el tiempo asignado a la exploración social.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los efectos de los fármacos sobre la agresión son complejos y más difíciles de interpretar que en otros paradigmas (Blanchard y cols., 2003). Nuestros datos indican que ninguna de las dosis de bupropión administradas de forma aguda han tenido efectos significativos en las categorías que miden la ofensa (amenaza y ataque), probablemente debido al hecho de que los animales no habían sido aislados previamente y, por esa razón, las medianas de la conducta de amenaza y ataque fueron muy bajas en todos los grupos. En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio, observamos que ninguna de las formas de administración aguda o crónica de nicotina durante 10 días redujo el tiempo asignado a la amenaza o ataque (Redolat y cols., 2000). En cambio, Johnson y colaboradores (2003) encontraron que la nicotina disminuyó la conducta de ofensa

(medido en el paradigma intruso-residente) y de agresión y defensa (*target biting*), aunque el efecto fue más potente en el último caso. El hecho de que diferentes paradigmas y dosis fueran utilizados en cada uno de estos estudios puede explicar, en parte, tales discrepancias en los resultados.

En nuestro estudio no se observaron comportamientos de escape/evitación y defensa/sumisión durante la prueba de la interacción social debido a que los ratones oponentes eran anosmiados y nunca iniciaron el ataque hacia los animales experimentales. Tampoco se dieron cambios evidentes en la categoría de comportamiento denominada "inmovilidad" durante el encuentro social tras la administración aguda de bupropión/nicotina o una combinación de las dos. Aunque no se midió directamente la actividad locomotora en estos experimentos, el efecto motor estimulante del bupropión con ratones ha sido confirmado en estudios previos en nuestro laboratorio con dosis similares de éste fármaco (Redolat y cols., 2005). Por otro lado, la ausencia de cambios en esta categoría de "inmovilidad" después de la administración de nicotina también confirma observaciones anteriores en ratones alojados individualmente (Redolat y cols., 2002).

El presente estudio indica, de acuerdo con los hallazgos anteriores (Redolat y cols., 2005) una disminución en el tiempo dedicado al cuidado corporal, incluyendo el autoaseo, en los ratones tratados con la dosis más alta de bupropión (40 mg/kg) solo o combinado con cualquiera de las dos dosis de nicotina. Nuestros resultados también concuerdan con estudios previos que han indicado que el bupropión atenúa la conducta de aseo observado durante la abstinencia de la morfina en ratas (Taraschenko y cols., 2005). En el presente experimento, solo la administración de la dosis más baja de bupropión (10 mg/kg) no disminuyó el tiempo asignado en el cuidado corporal. Sin embargo, cuando esta dosis fue administrada junto con nicotina, los mismos animales dedicaron menos tiempo a esta conducta que aquellos que recibieron solo nicotina, aunque las diferencias con el grupo tratado con vehículo no fueron significativas. En estudios anteriores, la administración aguda de nicotina no tuvo efectos significativos sobre el tiempo dedicado al cuidado corporal durante los encuentros agonísticos (Redolat y cols., 2000).

La conducta de escarbar puede observarse en ratones de todas las edades y en ambos sexos, y se puede considerar una conducta instintiva relacionada con la

adaptación a un nuevo entorno. En el presente trabajo, el tiempo dedicado a escarbar se redujo con la dosis más alta de bupropión (40 mg/kg) y con diferentes combinaciones de nicotina y bupropión, de acuerdo con resultados anteriores en ratones que fueron alojados individualmente (Redolat y cols., 2005). También, se constató que la nicotina por sí sola no tuvo efectos directos sobre esta conducta.

En cuanto a la conducta exploratoria observamos que la nicotina por sí sola no tuvo efectos significativos sobre la exploración no social. Este es un comportamiento que implica un importante componente motor (Rodríguez-Arias y cols., 1999). En cambio, la dosis más alta de bupropión aumentó el tiempo asignado a esta categoría, tanto cuando se administró solo o conjuntamente con cualquiera de las dos dosis de nicotina. La dosis más baja de bupropión aumentó este comportamiento al combinarlo con la dosis más baja de nicotina, a pesar de que la nicotina no tiene un efecto significativo por sí misma. Algunos autores interpretan el aumento de tiempo dedicado a la exploración no social como un intento de escapar de la arena (Brain y cols., 1991; Navarro y cols., 2004). Sin embargo, el aumento en esta categoría también se ha relacionado con los efectos ansiolíticos ejercidos por algunos fármacos (Espert y cols., 1993). Estos resultados indicarían que la administración aguda de bupropión, tanto solo como coadministrado con nicotina muestra efectos ansiolíticos. Sin embargo, hay otras interpretaciones posibles, ya que el claro aumento de este comportamiento exploratorio está asociado con los efectos estimulantes locomotores inducidos por el tratamiento agudo con la dosis más alta de bupropión en otras pruebas de conducta (Redolat y cols., 2005). Hemos detectado que la exploración no social aumentó claramente con la dosis más alta de bupropión (40 mg/kg), tanto administrado solo como con las dos dosis de nicotina. La dosis más baja de bupropión aumentó este comportamiento, pero sólo cuando se combinó con 0,5 mg/kg de nicotina. Además, los resultados obtenidos para la categoría de "exploración a distancia", una conducta que implica un mayor acercamiento al oponente (Vinader-Caerols y cols., 1992), fueron muy similares a los descritos para "exploración no social", aunque se obtuvieron medianas más bajas en esta categoría conductual. El aumento en el tiempo dedicado a explorar el oponente desde una distancia se han considerado indicativo de un aumento en la ansiedad (Navarro y Maldonado, 2002).

En conclusión, la evaluación etofarmacológica de la conducta de los ratones tratados de forma aguda con una combinación de bupropión y nicotina indica que la administración aguda de nicotina refuerza algunos de los efectos de la dosis más baja de bupropión, tales como la disminución en el cuidado corporal y de escarbar. De esta manera, nuestros datos confirman la complejidad de las acciones de comportamiento de la administración aguda de bupropión y subrayan la importancia de emplear una amplia gama de procedimientos experimentales a fin de determinar las propiedades farmacológicas y acciones conductuales de este medicamento, solo o en combinación con nicotina.

EXPERIMENTO 7: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL BUPROPIÓN Y LA NICOTINA SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL EN RATONES DE DIFERENTES EDADES²

1.- MATERIAL Y MÉTODO

1.1 Animales:

En este experimento se emplearon 330 ratones macho de la cepa OF1, obtenidos de laboratorios Charles-River (Barcelona-España). A su llegada al laboratorio los ratones adolescentes tenían una edad de 21 días, con un peso aproximado de 10-12 gr y los adultos de unos 50 días y un peso aproximado de 28-30 gr.

La mitad de los ratones se alojaron individualmente durante 15 días en cajas de plástico que median 24x13.5x13cm. Los restantes ratones fueron alojados en cajas de plástico opaco (25 x 25 x 15 cm) con el fin de que actuasen como oponente estándar en los test de interacción social. Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en experimentos anteriores.

1.2 Aparatos:

Los instrumentos empleados fueron los mismos que los descritos en el experimento anterior.

1.3. Tratamiento farmacológico:

Los fármacos utilizados fueron bupropión (Bupropion Hydrochloride) y nicotina ((-)-nicotina di-(+) tartrato sal que se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las dosis empleadas fueron: BUP10 (10 mg/kg de bupropión), BUP20 (20 mg/kg de bupropión) y BUP40 (40 mg/kg de bupropión) y las de nicotina NIC0.25 (0.25 mg/kg de nicotina), NIC0.5 (0.5 mg/kg de nicotina) y NIC1 (1 mg/kg de nicotina). Los dos grupos de control fueron: VEH-BUP (son ratones empleados como grupo control en el tratamiento con bupropión a los que se les inyectó salino 30 minutos antes del test) y VEH-NIC (son ratones a los que se les inyectó salino 15 minutos antes del test). Los

² Los resultados de esta investigación han sido publicados en la revista "Aggressive Behavior". Gómez, M.C., Carrasco, M.C., Redolat, R., 2008. Differential sensitivity to the effects of nicotine and bupropion in adolescent and adult male OF1 mice during social interaction tests. *Aggress. Behav.* 34, 369–379.

animales fueron distribuidos en 8 grupos según el tratamiento experimental a recibir. Todas las dosis fueron administradas en inyecciones con un volumen de 10 ml/kg.

1.4. Procedimiento

El procedimiento seguido para la realización de la prueba es el mismo que el empleado en el Experimento 6.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la naturaleza no continua de los datos obtenidos con la valoración etológica, se aplicó la prueba no paramétrica del test de Kruskal-Wallis (Siegel, 1985). Los datos analizados fueron.

1. Tiempo acumulado (en segundos) de cada una de las categorías conductuales.
2. Frecuencia de cada una de las categorías.

Las diferencias entre grupos de tratamientos se analizaron posteriormente en los casos apropiados, mediante el test "U" de Mann-Whitney, considerando la significación estadística a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

1) Efectos de la nicotina y el bupropión en ratones adolescente alojados individualmente

La **Tabla 7.1** muestra los valores (medianas y rangos del tiempo acumulado en segundos) dedicados a cada una de las categorías conductuales.

Tabla 7.1. Tiempo en medianas(rango entre parentesis) que dedican los ratones adolescentes a cada categoría conductual.

	VEH-N	VEH-B	NIC0.25	NIC0.50	NIC1	BUP10	BUP20	BUP40
Cuidado corporal^a	10,05 (5,8-14,6)	12,15 (0,4-23,5)	10,5 (0-15,6)	11,8 (2,4-47)	11,85 (3,5-33,8)	7,85 (0-24,9)	1,8 (0,3-5,4)	0,7** (0-12,2)
Escarbar^b	3,9 (0,8-15,9)	2,85 (0-14,5)	1,5 (0,2-18,5)	1,8 (0-15,2)	0,95 ⁺ (0-6,5)	1,4 (0-15,7)	0* (0-1,8)	0,4 (0-1,8)
Exploración no social^c	413,4 (286-503,2)	378,4 (137,3-501,8)	359 (253,5-529,5)	413,6 (346,7-452,3)	476,65 ⁺⁺ (396,9-528,9)	378,85 (125,9-492,9)	445,2 (302,6-527,5)	522,3*** (380,9-559,3)
Exploración a distancia^d	1,1 (0-9,6)	3,25 (0,5-10,1)	3 (0,4-16,4)	3 (0,2-12,1)	4,9 (0-19,3)	2,7 (0-28,1)	5,7* (2,1-12,5)	6,3* (1,9-35,8)
Exploración social^e	105,65 (50,2-268,9)	121,2 (0-390)	127,1 (9,5-236)	118,8 (64,8-190)	40,5 ⁺ (9,6-98)	92,55 (39-404,6)	70,85 (19,2-232,6)	13,6* (0-177,5)
Amenaza	0,15 (0-41)	4,8 (0-19,6)	0 (0-38,8)	7,4 (0-39,5)	0 (0-30)	9,35 (0-30,1)	8,45 (0-35,4)	0 (0-12,1)
Ataque	0 (0-100,3)	8,4 (0-48,8)	0 (0-48,2)	4,9 (0-42,3)	0 (0-35,5)	3,25 (0-83,5)	1,65 (0-61,8)	0 (0-1,2)
Latencia ataque	600 (77,4-600)	498 (62,1-600)	600 (54,5-600)	475,6 (77,8-600)	600 (141,3-600)	475,65 (77,8-600)	503,15 (94,8-600)	600 (432,6-6)
Evitación	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1,1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0,4)	0 (0-0,7)	0 (0-0)
Defensa	0 (0-0,7)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1,3)	0 (0-1,2)	0 (0-5,4)	0 (0-2,4)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-24,8)	0 (0-0)	0 (0-69)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

^aMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 **difiere con el grupo control VEH-BUP p<0.01 en Mann-Whitney "U"

^bMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.01 *difiere con el grupo control VEH-BUP p<0.05 ; † Difiere con el grupo control VEH-NIC p<0.05 en Mann-Whitney "U"

^cMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 ***difiere con el grupo control VEH-BUP p<0.001; †† Difiere con el grupo control VEH-NIC p<0.01 en Mann-Whitney "U"

^dMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.05 *difiere con el grupo control VEH-BUP p<0.05 en Mann-Whitney "U"

^eMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.05 *difiere con el grupo control VEH-NIC p<0.05 en Mann-Whitney "U"

El análisis Kruskal-Wallis indicó que el factor Tratamiento mostró diferencias significativas en el tiempo dedicado al cuidado corporal ($p < 0.001$). El test U de Mann-Whitney reveló que la dosis más alta de bupropión (BUP40) disminuyó esta conducta en comparación con BUP10 y el grupo control VEH-BUP ($p < 0.01$). La dosis media de bupropión (BUP20) redujo esta conducta en mayor medida que BUP10 ($p < 0.05$) (ver figura 7.1).

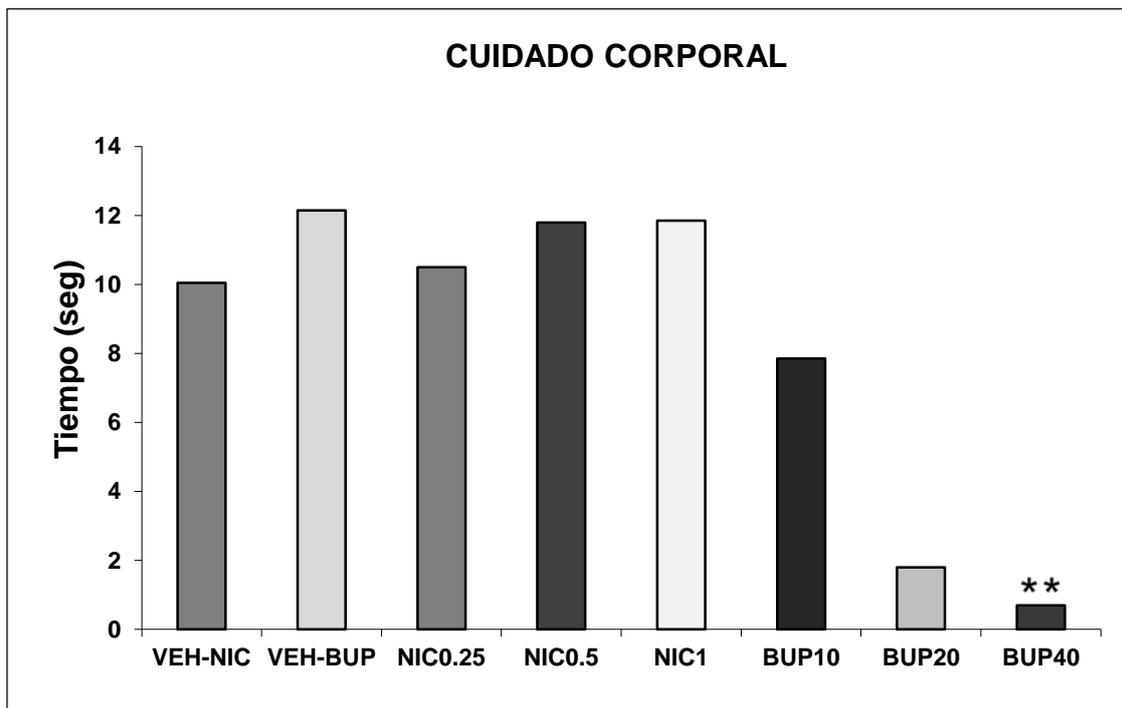


Figura 7.1. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a la conducta de cuidado corporal para cada grupo de tratamiento.

** $p < 0.01$ BUP40 vs VEH-BUP

También se obtuvieron diferencias significativas en la conducta de escarbar ($p < 0.01$). El tiempo dedicado a escarbar fue menor en el grupo BUP20 que en su grupo control VEH-BUP ($p < 0.05$). Finalmente, el grupo NIC1 empleó menos tiempo en esta conducta que VEH-NIC ($p < 0,05$) (ver figura 7.2).

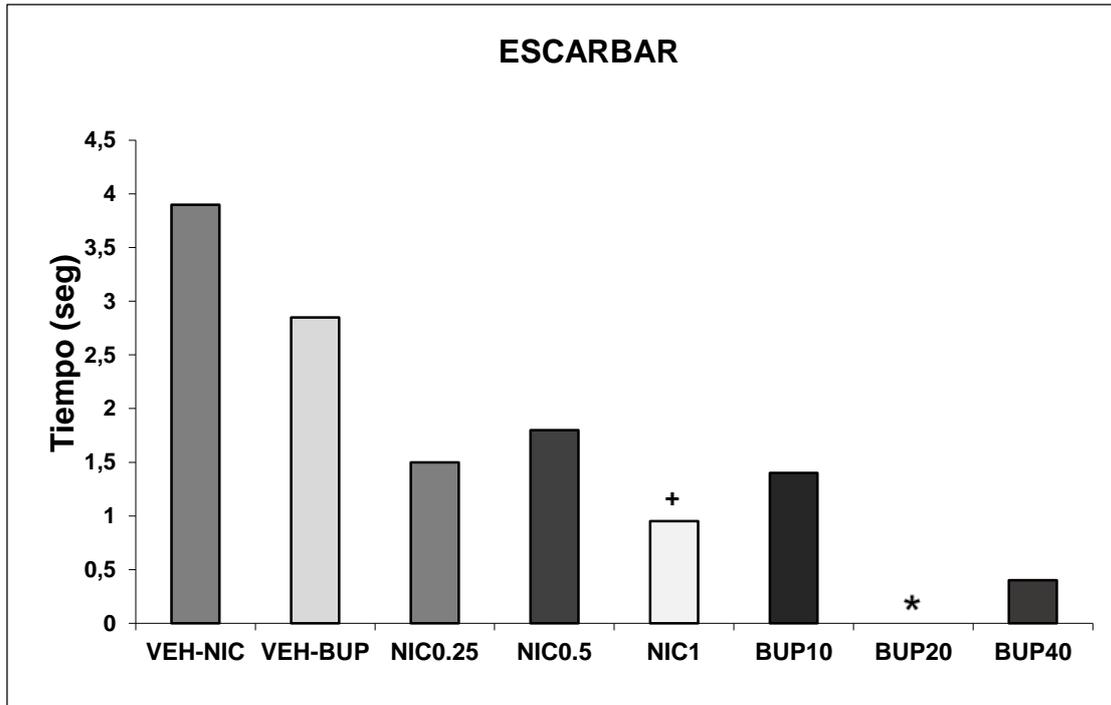


Figura 7.2. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a la conducta de escarbar para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP20 vs VEH-BUP

+ $p < 0.05$ NIC1 vs VEH-NIC

El tratamiento influyó significativamente en el tiempo dedicado a la exploración no social ($p < 0.001$). Los ratones tratados con altas dosis de bupropión (BUP40) dedicaron más tiempo a explorar el ambiente que los grupos BUP20 ($p < 0.05$), BUP10 y VEH-BUP ($p < 0.001$). El grupo que recibió la dosis más elevada de nicotina (NIC1) incrementó la exploración no social respecto al grupo control VEH-NIC y NIC0.5 ($p < 0.01$) (ver figura 7.3).

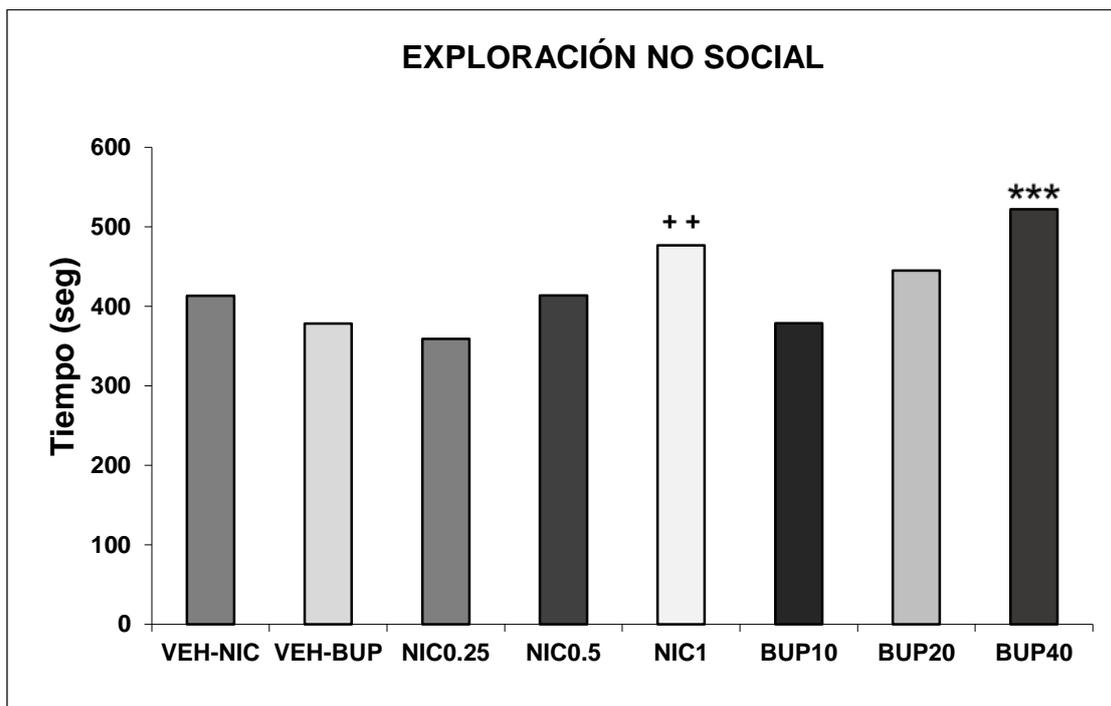


Figura 7.3. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración no social para cada grupo de tratamiento.

*** $p < 0.001$ BUP40 vs VEH-BUP.

++ $p < 0.01$ NIC1 vs VEH-NIC

En la categoría de exploración a distancia el test de Kruskal-Wallis reveló que el tratamiento tuvo efectos estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Los ratones que recibieron la dosis más alta de (BUP40) dedicaron más tiempo a esta conducta que el grupo control (VEH-BUP) ($p < 0.05$). De forma similar, los que recibieron la dosis intermedia de bupropión (BUP20) pasaron más tiempo realizando exploración a distancia que los grupos VEH-BUP ($p < 0.05$) (ver figura 7.4).

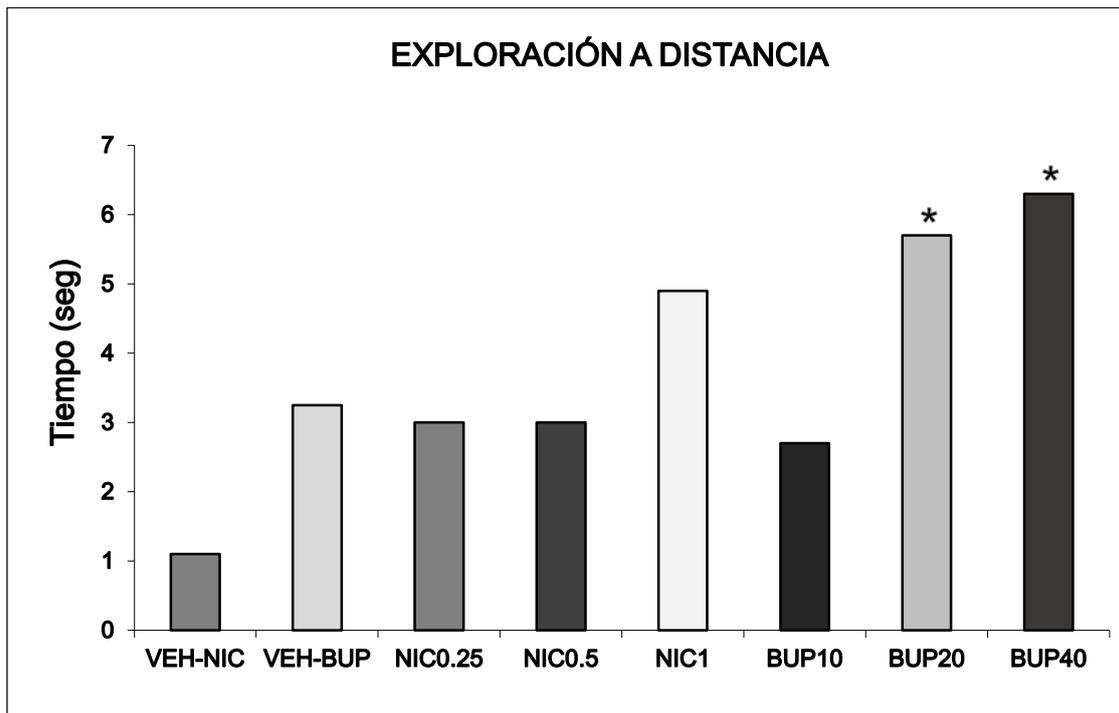


Figura 7.4. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración a distancia para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP20 vs VEH-BUP, BUP40 vs VEH-VEH

También fueron significativas las diferencias entre los grupos en la conducta de exploración social ($p < 0.05$). Los ratones que recibieron la dosis alta de (BUP40) fueron los que dedicaron menos tiempo a dicha conducta que los grupos BUP10 y VEH-BUP ($p < 0.05$). Los animales que recibieron nicotina (NIC1) estuvieron menos tiempo en esta conducta que el grupo control VEH-NIC, NIC0.5 y NIC0.25 ($p < 0.05$) (ver figura 7.5).

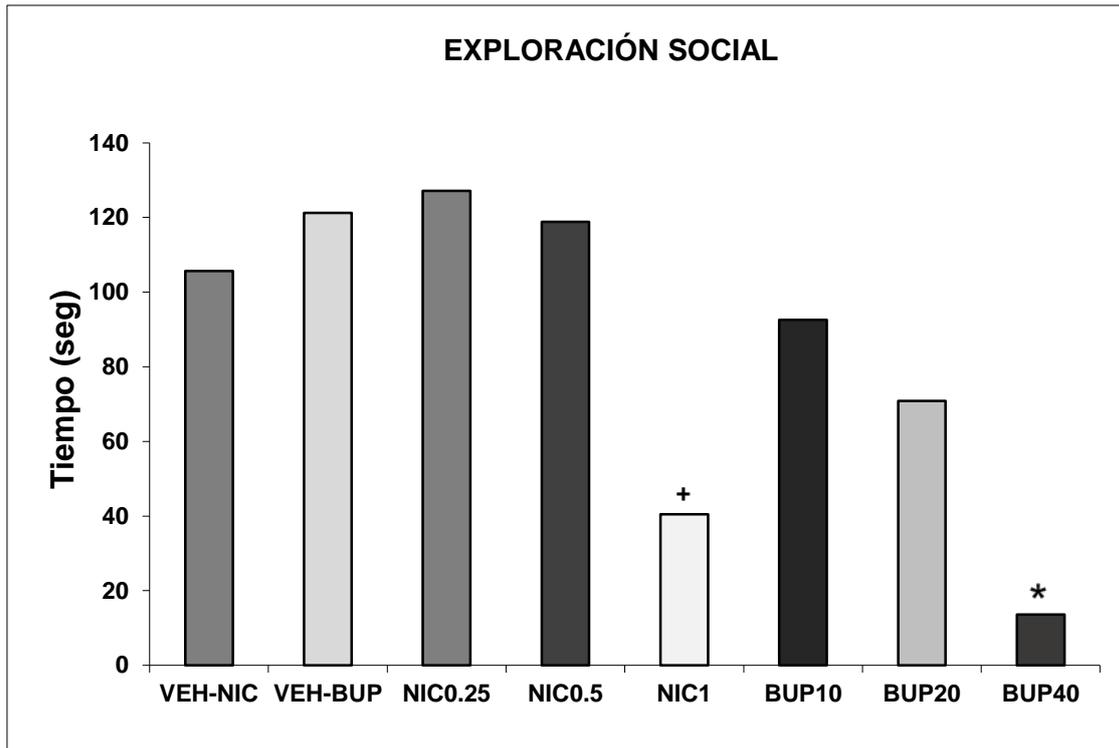


Figura 7.5. . Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración social para cada grupo de tratamiento. (en la grafica falta la linea inferior)

* $p < 0.05$ BUP40 vs VEH-BUP

+ $p < 0.05$ NIC1 vs VEH-NIC

El análisis Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en el tiempo dedicado a las conductas ofensivas (amenaza y ataque) en ratones adolescentes y adultos, mostrando similares conductas ofensivas cuando eran tratados con nicotina o con bupropión. La categoría de inmovilidad no resultó afectada por el tratamiento con nicotina o bupropión. Las conductas defensivas (huida y defensa) tampoco fueron observadas.

2) Efectos de la nicotina y el bupropión en ratones adultos alojados individualmente

En la Tabla 7.2, se recogen las diferencias significativas entre la nicotina y el bupropión y sus respectivos vehículos en ratones adultos en cada una de las categorías conductuales.

Tabla 7.2. Tiempo en medianas(rango entre parentesis) que dedican los ratones adultos a cada categoría conductual

	VEH-N	VEH-B	NIC0.25	NIC0.50	NIC1	BUP10	BUP20	BUP40
Cuidado corporal^f	11,55 (3,8-20,8)	7,5 (2,3-43)	9,7 (3,4-17,6)	10 (4,6-52,4)	15,7 ⁺ (1,4-34,3)	5,1* (1,9-7,6)	3,1* (0,3-19,5)	0,7** (0-1,9)
Escarbar^b	25,85 (4,4-46,6)	31,4 (1,9-44,5)	15,6 ⁺ (2,3-47,5)	2,7 (0-70,1)	1,95 ⁺ (0,3-7,8)	5,5* (0-30,1)	1,7* (0-14,7)	0* (0-0,7)
Exploración no social^f	381,35 (323,2-454,3)	351,1 (251,6-457)	381,9 (309-444,2)	378,2 (300,6-502,1)	417,35 (345,7-456,4)	396,3 (302,1-488,6)	446,9* (366,8-493,2)	490,7* (368,8-536,5)
Exploración a distancia^d	3,35 (0,9-9,3)	0,7 (0-4,4)	1,3 (0,4-4,2)	2,1 (0-8,1)	4,65 ⁺⁺⁺ (0,3-10,3)	4,5** (0,7-13)	4** (0,8-19)	11,2** (4,7-15,8)
Exploración social^e	85,95 (42,4-183)	122,5 (55,2-195,1)	89,8 (74,9-139,6)	119,7 (30,3-214)	103,95 (53,6-119)	108,7 (19,5-177,7)	62,1* (34-148,4)	28,45* (10-187,8)
Amenaza	18,2 (0-37,8)	16,25 (0-130,8)	23,8 (0-52,2)	14,8 (0-32,9)	7,1 (0-50,4)	11,4 (7,6-47,8)	19 (0-36,2)	1,55 (0-44)
Ataque	29 (0-64)	11,1 (0-88,7)	30,7 (0-80,2)	3 (0-44,4)	8 (0-68,1)	26,5 (0-87)	12,1 (0-76,8)	0,2 (0-74,1)
Latencia ataque	50,55 (10,5-600)	382,6 (14,7-600)	85,9 (8,4-600)	287,6 (0-600)	390,6 (17,9-600)	67,4 (4,4-600)	90,2 (0-600)	562 (28,4-600)
Evitación/huida	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Defensa/unión	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

^aMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0,001 **difiere con el grupo VEH-BUP p<0,01; en Mann-Whitney "U"

^bDifiere con el grupo VEH-BUP p<0,05; ^cDifiere con el grupo control VEH-NIC p<0,05 en Mann-Whitney "U"

^dMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0,001 *difiere con el grupo control VEH-BUP p<0,05; ^eDifiere con el grupo control VEH-NIC p<0,05 en Mann-Whitney "U"

^fMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0,001 **difiere con el grupo control VEH-BUP p<0,01 ****Difiere con el grupo control VEH-NIC p<0,001 en Mann-Whitney "U"

^gMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0,001 **difiere con el grupo control VEH-BUP p<0,01 ****Difiere con el grupo control VEH-NIC p<0,001 en Mann-Whitney "U"

^hMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0,05 *difiere con el grupo control VEH-BUP p<0,05 en Mann-Whitney "U"

El análisis realizado mediante el test de Kruskal-Wallis reveló que el tratamiento resultó estadísticamente significativo en el tiempo dedicado al cuidado corporal en los ratones adultos ($p < 0.001$). El test U de Mann Whitney indicó que el grupo BUP40 dedicó menos tiempo al aseo que los grupos BUP10 y BUP20 y su control VEH-BUP ($p < 0.01$). Los ratones tratados con las dosis intermedia y baja de bupropión (BUP10 y BUP20) también disminuyeron el autoaseo en comparación con los grupos VEH-BUP ($p < 0.05$), mientras que los ratones tratados con altas dosis de nicotina (NIC1) aumentaron esta conducta en comparación con NIC0.25 o VEH-NIC ($p < 0.05$) (ver figura 7.6).

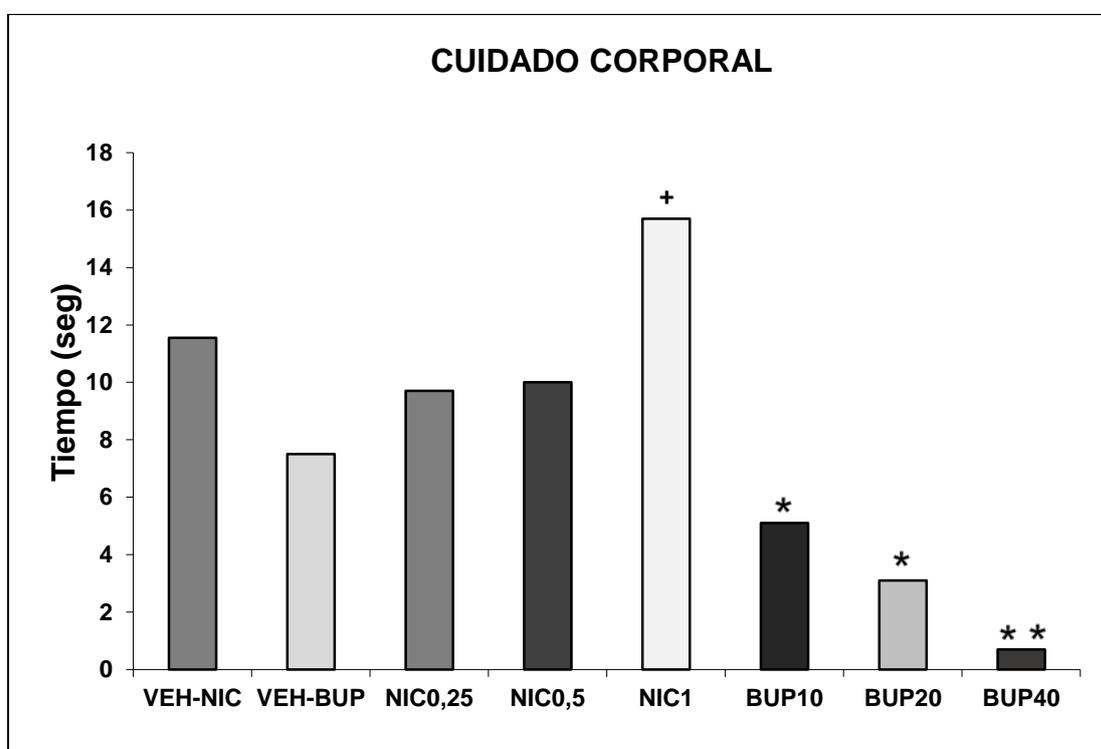


Figura 7.6. . Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a la conducta de cuidado corporal para cada grupo de tratamiento.

** $p < 0.01$ BUP40 vs VEH-BUP.

* $p < 0.05$ BUP 10 vs VEH-BUP
BUP 20 vs VEH-BUP

+ $p < 0.05$ vs VEH-NIC

En la conducta de escarbar se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$). Los ratones tratados con la dosis más alta de bupropión (BUP40) dedicaron menos tiempo a esta conducta que su grupo control VEH-BUP o los grupos BUP10, BUP20 ($p < 0.05$). La dosis baja e intermedia de bupropión BUP10 y BUP20 produjo una significativa disminución de la conducta de escarbar en comparación con su grupo control VEH-BUP ($p < 0.05$). En cuanto a los animales tratados con nicotina, observamos que la dosis más alta (NIC1) redujo la conducta de escarbar en comparación con el grupo control VEH-NIC ($p < 0.05$). Los ratones tratados con la dosis más baja de nicotina NIC0.25 también la disminuyó respecto a su grupo control (VEH-NIC) ($p < 0.05$) (ver figura 7.7).

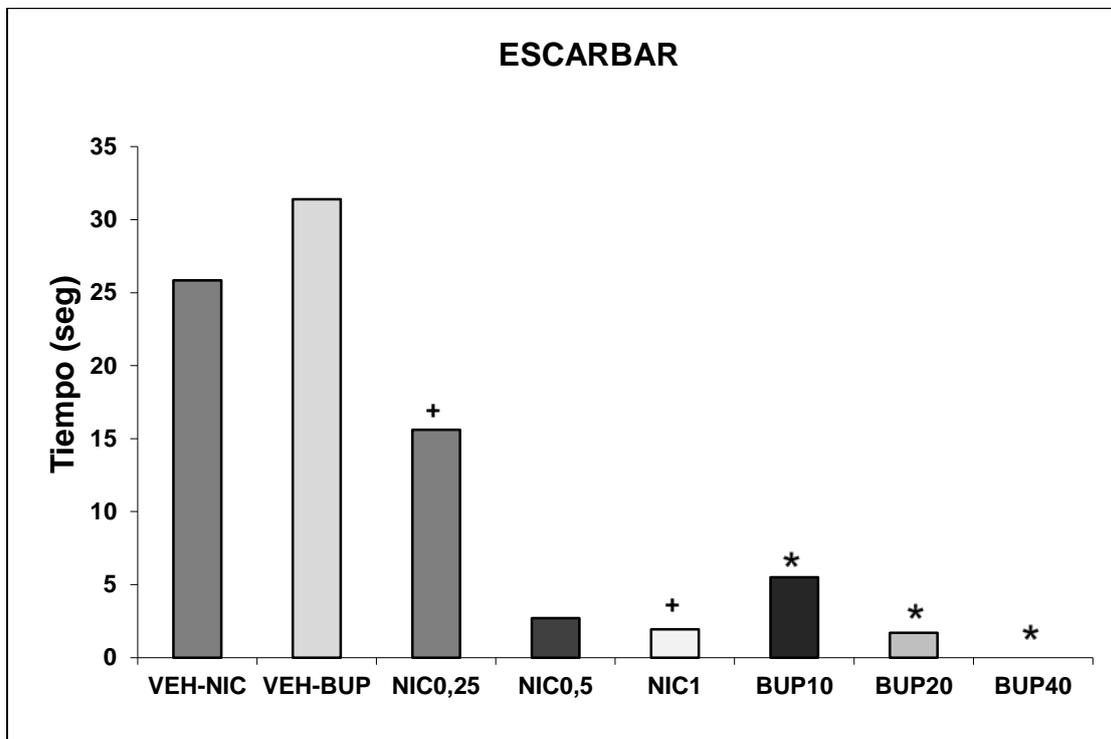


Figura 7.7. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a la conducta de escarbar para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP10 vs VEH-BUP
 BUP20 vs VEH-BUP
 BUP40 vs VEH-BUP
 + $p < 0.05$ NIC0.25 vs VEH-NIC
 NIC1 vs VEH-NIC

Con respecto al tiempo dedicado a la exploración no social, el test de Kruskal-Wallis indicó que el tratamiento tuvo efectos significativos en esta categoría conductual ($p < 0.001$). Los animales que recibieron la dosis más alta de bupropión (BUP40) pasaron más tiempo explorando el ambiente que los grupos VEH-BUP y BUP10 ($p < 0.05$). Asimismo, la dosis intermedia (BUP20) aumentó el tiempo dedicado a la exploración no social en comparación con el grupo control VEH-BUP ($p < 0.05$). Por último, el análisis estadístico indicó que los ratones tratados con la dosis más alta de nicotina (NIC-1) incrementaron dicha conducta respecto a los grupos NIC0.25 ($p < 0.05$) (ver figura 7.8).

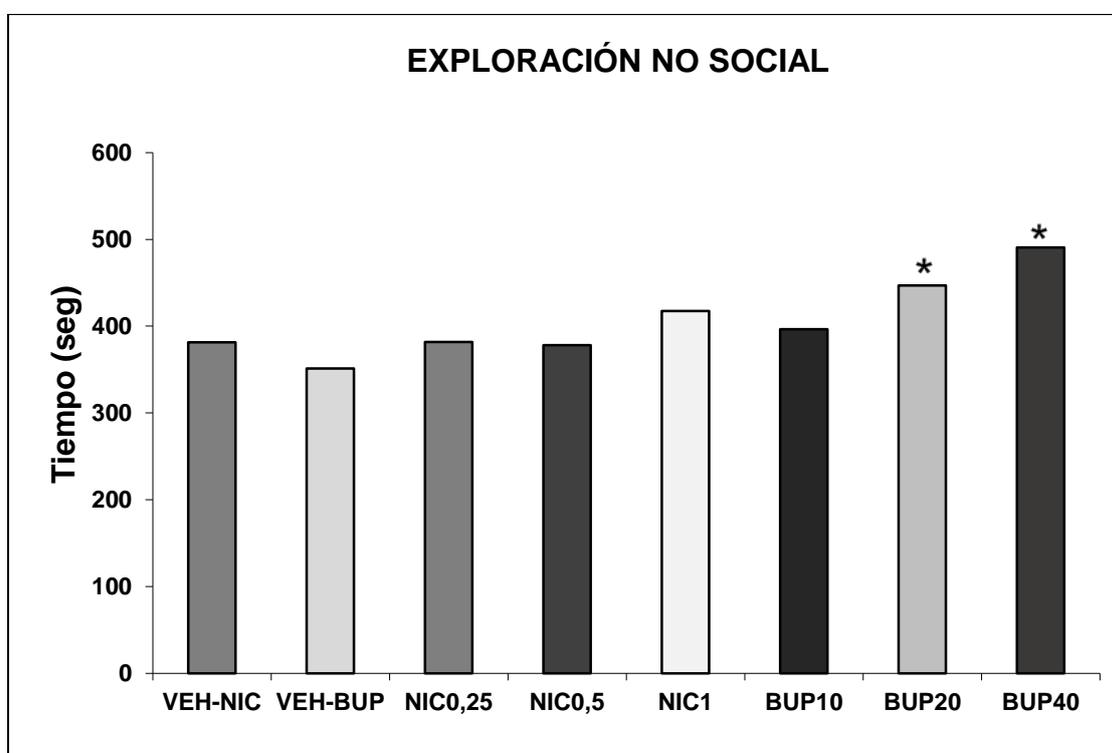


Figura 7.8. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración no social para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP20 vs VEH-BUP,
BUP40 vs VEH-BUP

El factor tratamiento también resultó estadísticamente significativo en la conducta de exploración a distancia ($p < 0.001$). La dosis más alta de bupropión (BUP40) incrementó el tiempo dedicado a esta categoría conductual en mayor medida que los grupos VEH-BUP y BUP10, ($p < 0.01$). Los animales que recibieron la dosis baja e intermedia de bupropión BUP 10 y BUP20 dedicaron más tiempo explorando al oponente desde la distancia que el grupo control VEH-BUP ($p < 0.01$). Igualmente, el grupo que recibió la dosis más alta de nicotina (NIC1) aumentó el tiempo dedicado a explorar a distancia respecto a los grupos NIC0.25 ($p < 0.02$) y VEH-NIC ($p < 0.001$) (ver figura 7.9).

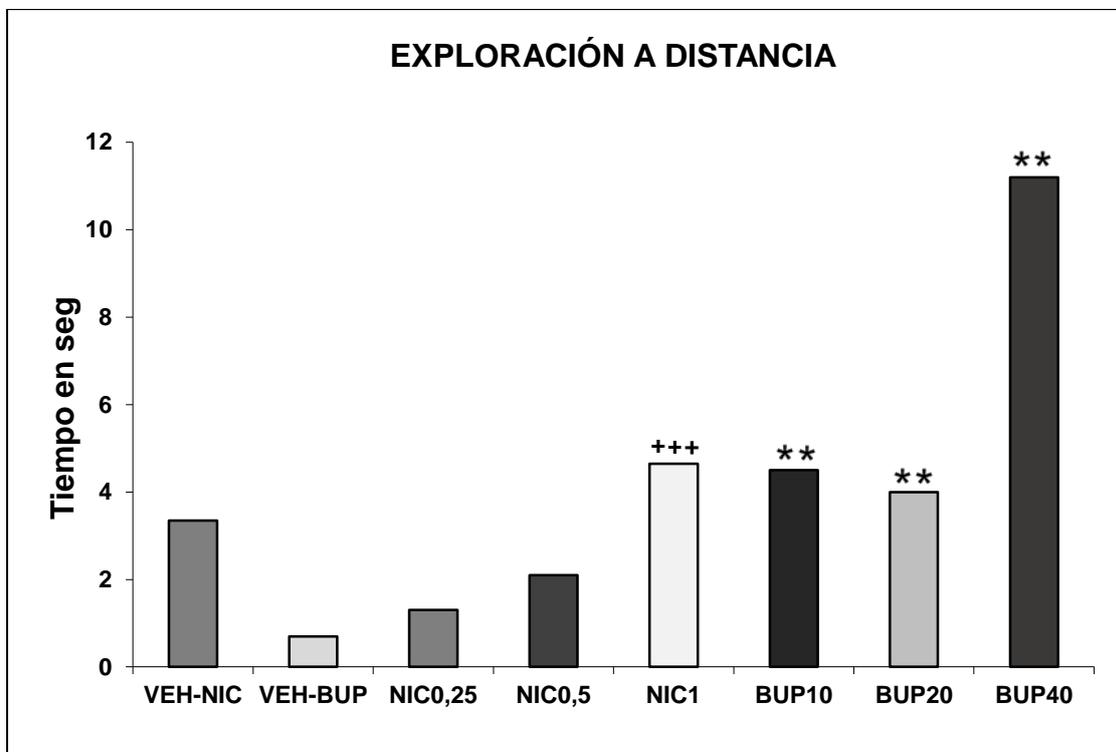


Figura 7.9. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración a distancia para cada grupo de tratamiento.

** $p < 0.01$ BUP10 vs VEH-BUP

BUP20 vs VEH-BUP

BUP40 vs VEH-BUP

+++ $p < 0.001$ NIC1 vs VEH-NIC.

En la categoría de exploración social ($p < 0.05$), las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas. La dosis alta de bupropión (BUP40) disminuyó dicha conducta cuando se compara con los grupos que recibieron la dosis intermedia y baja (BUP10 y BUP20) ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) y el VEH-BUP ($p < 0.05$). Los animales tratados con la dosis intermedia de bupropión (BUP20) dedicaron menos tiempo a esta conducta respecto al control (VEH-BUP) ($p < 0.05$) (ver figura 7.10).

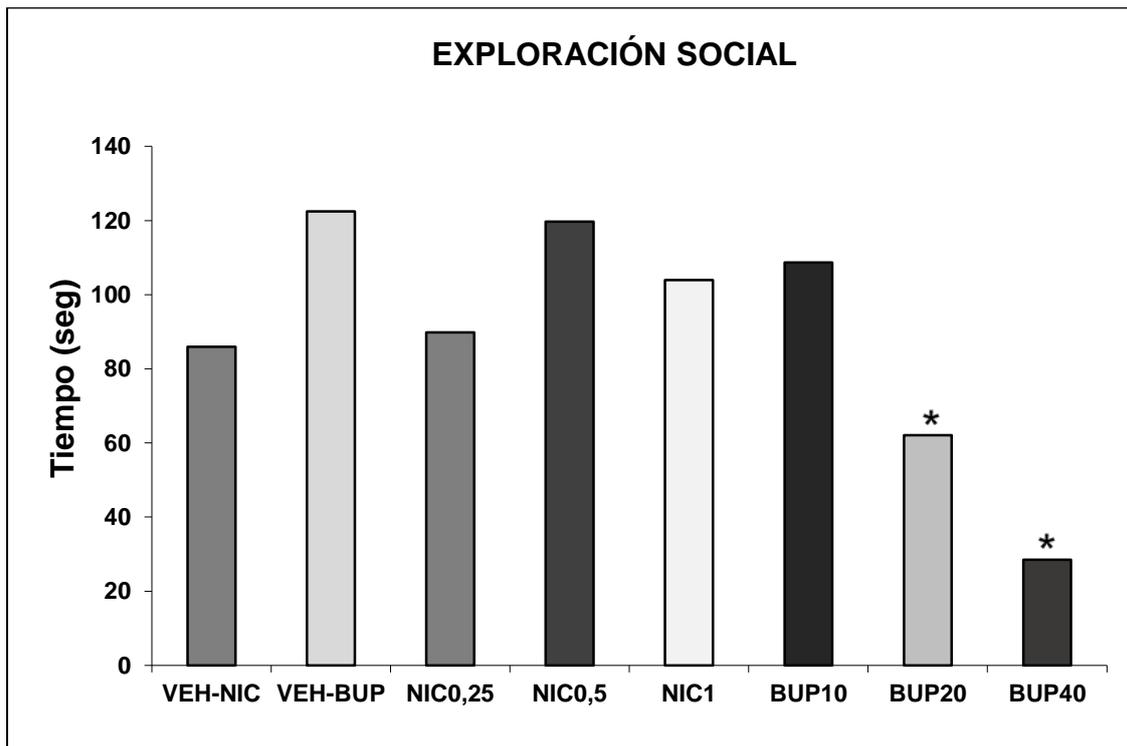


Figura 7.10. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración social para cada grupo de tratamiento.

* $p < 0.05$ BUP40 vs VEH-BUP
BUP20 vs VEH-BUP

El análisis Kruskal-Wallis no reveló diferencias significativas en el tiempo dedicado a las conductas ofensivas o en las categorías defensivas.

4. DISCUSIÓN

Nuestro principal objetivo en este trabajo fue comparar en ratones adolescentes y adultos los efectos del tratamiento agudo con nicotina o bupropión en la conducta de interacción social. Para ello hemos evaluado los efectos de estos dos fármacos en los ratones que habían sido aislados durante 15 días y posteriormente confrontados con oponentes estándar. Durante estos encuentros agonísticos, los ratones alojados individualmente muestran además de un mayor comportamiento agresivo otro tipo de respuestas como la interacción social y actividades motoras (Redolat y cols., 2005). Se ha comprobado que un período de aislamiento más corto (7 días) es seguido por un incremento de la interacción social tanto en los adolescentes (Varlinskaya y cols., 1999) como en ratas adultas (van Ree y Niesink, 1983), aunque los efectos del aislamiento social parecen ser más significativos en los roedores adolescentes (Einon y Morgan, 1978). De hecho, los ratones adolescentes pasan más tiempo en interacciones sociales con compañeros de similares características que los más jóvenes y/o de mayor edad (Vanderschuren y cols., 2014). En nuestro estudio se observó una clara disminución del tiempo dedicado a la exploración social tanto en los ratones adolescentes (40 mg/kg) como en los ratones adultos (20 y 40 mg/kg) tras la administración de bupropión. También se obtuvo un efecto significativo en los grupos tratados con nicotina, aunque este efecto solo alcanzó significativamente a los ratones adolescentes: el grupo tratado con la dosis más alta de nicotina (1mg/kg) dedicó menos tiempo a este comportamiento que su grupo de control. En los ratones adultos, aunque los efectos de la nicotina no alcanzaron significación estadística, se observó una tendencia hacia un aumento en el tiempo asignado a esta categoría conductual, sobre todo en los ratones que recibieron la dosis más alta. Estos resultados indican que los efectos de la nicotina sobre la interacción social difieren en ratones adolescentes y adultos.

Se ha propuesto que el incremento en el tiempo dedicado a esta categoría conductual sería un reflejo de la actividad ansiolítica, mientras que una disminución sería indicativo de actividad ansiogénica (Redolat y cols., 1991, 2005, Navarro y cols., 2004, 2006). Nuestros resultados sugieren que el bupropión ejerce una actividad ansiogénica en ambos grupos de edad. En cambio, encontramos que la nicotina sólo incrementó la ansiedad en ratones adolescentes y únicamente cuando se administra a dosis elevadas. Estos resultados son difíciles de comparar con los de estudios anteriores

que, por lo general, se han realizado utilizando otros paradigmas. Nuestros datos indican que no sólo la dosis utilizada, sino también de la edad de los animales, son variables importantes en la evaluación de los efectos de la nicotina sobre la ansiedad.

Por otro lado, el aumento de conductas defensivas durante los encuentros agresivos podría ser indicativo de un efecto ansiogénico (Estellés y cols., 2004). Nuestros datos muestran que estas categorías conductuales (evitación/huida y defensa/sumisión) no se vieron afectadas significativamente por el tratamiento de nicotina o bupropión, aunque dicho resultado podría estar relacionado con el hecho de que los ratones aislados se enfrentan a oponentes anónimos que no dirigen ataque hacia ellos. Una de las categorías claramente alterada por el tratamiento farmacológico fue el cuidado corporal. Durante los encuentros agonísticos, la administración de bupropión (especialmente en dosis altas) indujo una disminución en el tiempo asignado a al aseo tanto en ratones adolescentes como adultos, confirmando estudios anteriores (Redolat y cols., 2005). En cambio, la dosis más alta de nicotina indujo un aumento del aseo, pero sólo entre los ratones adultos. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que todos los grupos dedicaron relativamente poco tiempo a esta categoría conductual, y dichas modificaciones del tiempo dedicado al aseo son difíciles de interpretar como un reflejo de los cambios en el estado emocional o de las tendencias exploratorias.

Otra categoría conductual que también parece alterarse por el tratamiento es la de escarbar. En ratones adultos, se produjo una disminución clara en el tiempo dedicado a esta conducta tras el tratamiento con todas las dosis de bupropión (10, 20 y 40 mg/kg). En ratones adolescentes, sólo los que recibieron la dosis intermedia (20 mg/kg) dedicaron menos tiempo en este comportamiento que su propio grupo de control (VEH-BUP). En cuanto a los efectos de la nicotina en los adolescentes, la dosis más alta de este fármaco (1 mg/kg) produjo una disminución en el tiempo que los animales dedicaron a escarbar en comparación con el grupo de control VEH-NIC. Este efecto significativo con la administración de nicotina también se observó en ratones adultos tanto con la dosis más alta (1 mg/kg) como con la más baja (0.25 mg/kg). El aumento en la conducta de escarbar de los ratones suele darse después de la administración de fármacos ansiolíticos (Cutler, 1993), pero también se ha relacionado con las propiedades ligeramente aversivas al serrín (D' Amoto y Cabib, 1987).

Los ratones adultos fueron más sensibles que los adolescentes a los efectos de bupropión en la exploración no social. En los adultos, tanto 20 y 40 mg/kg de bupropión aumentaron el comportamiento exploratorio en comparación con su propio grupo control. En ratones adolescentes, la dosis más alta aumentó este comportamiento, pero no se observaron efectos significativos tras la administración de las dosis más bajas. El incremento en la exploración no social después de recibir diferentes tratamientos se ha relacionado con un aumento en el nivel de ansiedad (Navarro y cols., 2004). Sin embargo, puesto que este comportamiento está fuertemente influenciado por los cambios en la locomoción, dicho aumento con dosis altas de bupropión se ha atribuido a la hiperactividad motora inducida por este fármaco (Redolat y cols., 2005). Por lo tanto, la mayor sensibilidad de ratones adultos a la dosis intermedia de bupropión podría estar relacionado con el hecho de que muestran un nivel basal bajo de actividad motora en comparación con los adolescentes (Redolat y cols., 2005). En cambio, la administración de nicotina sólo indujo un aumento significativo en el tiempo dedicado a este comportamiento en los ratones adolescentes tratados con la dosis más alta (1 mg/kg). Estos resultados confirman estudios anteriores que indican que los ratones adolescentes son más sensibles a los efectos conductuales de la nicotina (Adriani y cols., 2002; Schochet y cols., 2004).

El bupropión aumentó significativamente la exploración a distancia en los adolescentes (20 y 40 mg/kg) y los ratones adultos (todas las dosis) en comparación con su control. La administración de nicotina sólo indujo cambios significativos en ratones adultos con la dosis más elevada (1 mg/kg). Es importante señalar, sin embargo, que el tiempo asignado a esta categoría fue bajo en todos los grupos y, por lo tanto, los resultados son difíciles de interpretar. La exploración a distancia es un comportamiento que suele preceder a la conducta agresiva (Pedraza y cols., 2007) y en el presente estudio observamos unos niveles bajos en la conducta ofensiva en todos los grupos, probablemente debido a la corta duración del período de aislamiento.

Nuestros resultados confirman estudios anteriores que indican que existen respuestas conductuales diferentes a fármacos estimulantes en función a la edad en que los animales son expuestos a estas sustancias (Collins y Izenwasser, 2004). En general, podría concluirse que los datos de nuestra investigación apoyan la creencia de que la adolescencia es un período de desarrollo en el que la exposición a la nicotina induce

cambios de comportamiento que difieren de los observados en los sujetos expuestos más tardíamente y sugieren que también hay una sensibilidad diferencial a los efectos del bupropión en algunas de las categorías conductuales cuando se compararon los dos grupos de edad.

EXPERIMENTO 8: CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y EFECTOS DEL BUPROPIÓN SOBRE LA CONDUCTA DE INTERACCIÓN SOCIAL.

1.MATERIAL Y MÉTODO

1.1. Animales

En este experimento se emplearon 353 ratones macho de la cepa OF1, obtenidos de laboratorios Charles-River (Barcelona-España). Los animales tenían una edad de 23-24 días, con un peso aproximado a la llegada al laboratorio de 10-12 grs. Fueron mantenidos en el animalario en las mismas condiciones que las descritas en los anteriores experimentos. A su llegada al laboratorio los ratones se distribuyeron en dos condiciones de alojamiento distintas: 108 ratones se mantuvieron aislados y los restantes 245 animales se agruparon de cinco en cinco en jaulas de plástico opaco (25 x 25 x 15 cm). Cuando alcanzaron aproximadamente 43/44 días de edad se procedió a modificar sus condiciones de alojamiento. Estas condiciones serán descritas de forma detallada en el apartado del procedimiento.

1.2.Aparatos

Los instrumentos y el test utilizado fueron los mismos que en los Experimentos 6 y 7.

1.3.Fármaco

El fármaco utilizado fue bupropión (Bupropion Hydrochloride). Las dosis empleadas fueron: BUP10 (10 mg/kg), BUP20 (20 mg/kg) y BUP40 (40 mg/kg). Todas las dosis fueron administradas en inyecciones con un volumen de 10 ml/kg.

1.4.Procedimiento

Tal como se mencionó anteriormente los animales fueron distribuidos en una primera fase en dos grupos al llegar al laboratorio: la mitad de los ratones se alojaron en grupos de cinco y el resto fueron alojados individualmente. A las dos semanas se inició la segunda fase en la que los dos grupos iniciales se subdividieron en cuatro (agrupados/agrupados o agrupados/aislados; aislados/aislados o aislados/agrupados), y a cada uno de estos grupos se les administró diferentes dosis de bupropión (BUP10, BUP20, BUP40 y VEH). La denominación que recibió cada grupo corresponde a la modalidad de alojamiento, seguido del tratamiento. Con objeto de simplificar la denominación de los grupos se utilizó una abreviatura, de modo que:

AIS: indica que los animales permanecieron aislados en las dos fases del experimento.

AIS/GR: indica que los animales permanecieron aislados en la primera fase y agrupados en la segunda.

GR: indica que los animales permanecieron agrupados en las dos fases del experimento.

GR/AIS: indica que los animales permanecieron agrupados en la primera fase y aislados en la segunda.

El orden de las siglas corresponde a la denominación del alojamiento y la administración de los tratamientos. Por ejemplo, la denominación AIS/GR-BUP40 indicaría que este grupo experimental estuvo alojado aislado en la primera fase y, en la segunda fase estuvo agrupado y que recibió la dosis de 40 mg/kg de bupropión (ver figura 8).

El resto del procedimiento empleado en esta investigación fue el mismo que los dos experimentos anteriores.

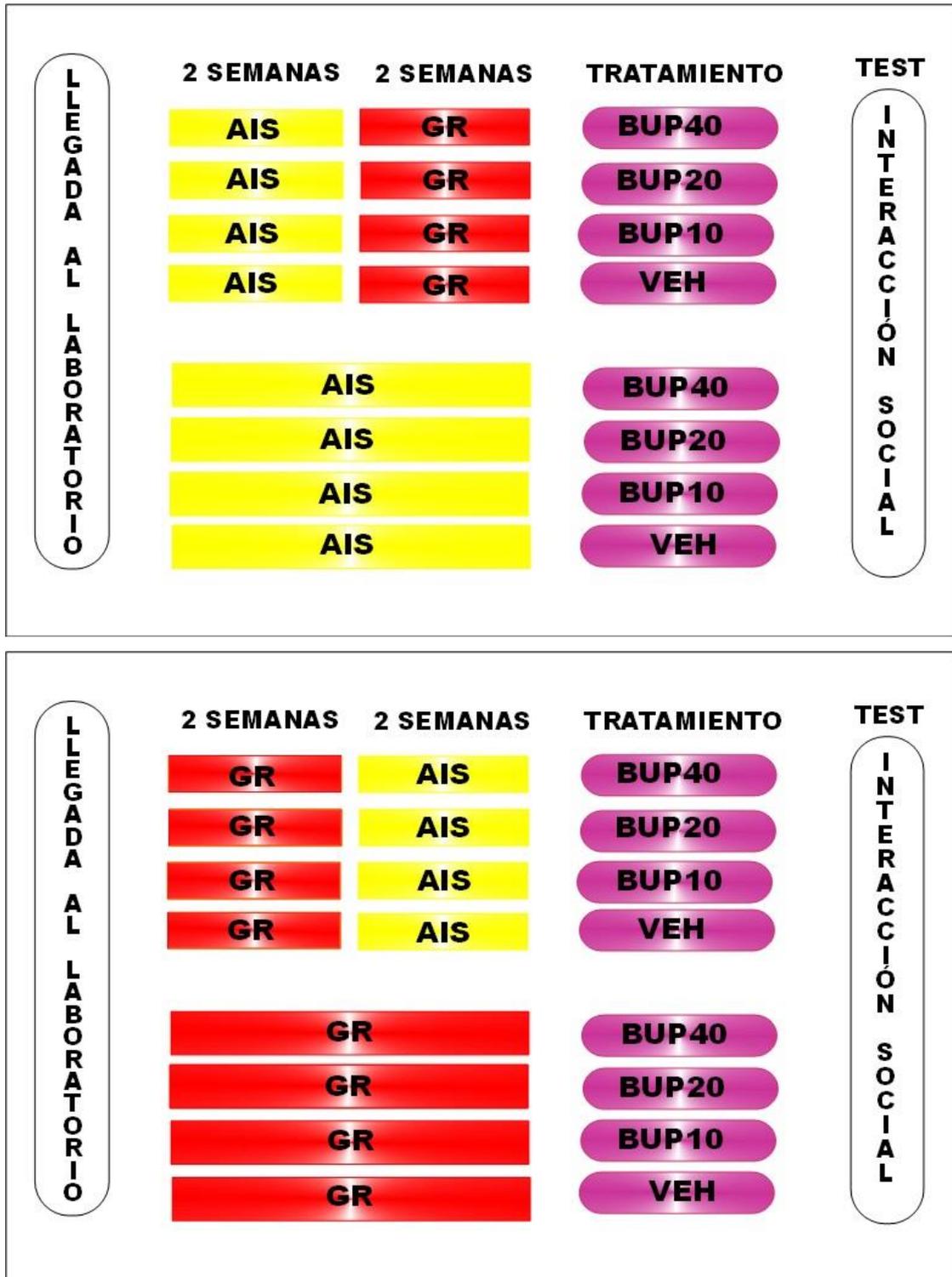


Figura 8 Diseño experimental y procedimiento seguido en la administración del tratamiento con bupropión.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la naturaleza no continua de los datos obtenidos con la valoración etológica, se aplicó la prueba no paramétrica del test de Kruskal-Wallis (Siegel, 1985). Los datos analizados fueron.

1. Tiempo acumulado (en segundos) de cada una de las categorías conductuales.
2. Frecuencia de cada una de las categorías.

Las diferencias entre grupos de tratamientos se analizaron posteriormente en los casos apropiados mediante el test U de Mann-Whitney, considerando la significación estadística a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

En la exposición de los resultados obtenidos se consideraran dos tipos de datos: comparación entre efectos del tratamiento con bupropión y las modalidades de alojamientos (aislados y aislados/agrupados), y comparación entre los efectos del tratamiento con bupropión y las modalidades de alojamientos (agrupados y agrupados/aislados).

Efectos del bupropión en ratones aislados/aislados–aislados/agrupados

Las conductas en las que se han observado diferencias estadísticamente significativas son: cuidado corporal, escarbar, exploración no social, exploración social, amenaza, ataque, huida, defensa y latencia de ataque (ver Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Tiempo en medianas (rango) entre parentesis que dedican los ratones adultos a cada categoría conductual en las modalidades de alojamiento aislados y agrupados

	AISLADOS				AISLADOS/AGRUPADOS			
	AIS-VEH	AIS-BUP10	AIS-BUP20	AIS-BUP40	AIS/GR-VEH	AIS/GR-BUP10	AIS/GR-BUP20	AIS/GR-BUP40
Cuidado corporal^a	11.25 (5.7-31.1)	5.8 (0.5-15.7)	4.5 ⁺ (1.2-17.9)	0.7 ⁺⁺ (0.3-9.5)	14.4 (0.7-43.2)	7.4 (3.6-9.5)	1.95* (0-34.9)	1.2* (0.3-2.06)
Escurbar^b	22.2 (9.3-36.8)	11.1 (0.2-48.7)	6 ⁺⁺ (1.6-12.9)	3.4 ⁺⁺ (0.3-5.8)	19.9 (2.7-115.1)	14.5 (0.5-36.5)	3.9* (0.2-9.3)	3.5* (1.3-7.3)
Exploración no social^c	423.4 (303.7-508.1)	386.1 (217-475.8)	454.4 (326.3-509.4)	502.9 (194-565.7)	428.7 (317.1-544.1)	434.2 (238.4-518.9)	479.5 (399-537.1)	559.8** (517.5-571.2)
Exploración a distancia	10.65 (1.6-20.5)	14.5 (6.3-139.3)	16.3 (7.1-28.4)	11.9 (0.9-52.1)	9.3 (4.3-25.1)	7.85 (4.7-28.8)	7.85 (4.7-28.8)	14.75 (12.3-24)
Exploración social^d	94.8 (38-219)	82.1 (30.5-294)	79.4 (15.4-183.6)	46.5 ⁺ (0-392)	84.9 (0-194)	117 (55.4-140.2)	68.3 (2.9-122.4)	15.2* (5.7-54.8)
Amenaza^e	20.1 (0-33.1)	41.3 ⁺ (0-106.7)	25.9 (1.3-47.2)	7.8 (0-59.3)	0 (0-36.9)	0 (0-0)	0 (0-12.9)	0 (0-0.4)
Ataque	12.5 (0-36.4)	13.4 (0-101)	13.1 (0-67)	5.6 (0-34.5)	0 (0-27.6)	0 (0-1.6)	0 (0-14)	0 (0-0.3)
Latencia ataque	350 (142-600)	264.3 (28-600)	234 (45.6-600)	343.3 (96-600)	379.8 (53.7-600)	287.4 (28-600)	237.7 (8.9-600)	600 (130.7-600)
Evitación/huida^f	0 (0-3.1)	0 (0-1)	0 (0-0.9)	0 (0-11.2)	0 (0-0)	0 (0-1.9)	0 (0-0)	0* (0-18)
Defensa/submisión^g	0 (0-12.3)	0 (0-8.2)	1.1 (0-4.1)	0 (0-24.1)	0 (0-0)	0 (0-0.4)	0* (0-1.5)	0* (0-69.4)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-4)	0 (0-30.4)	0 (0-228.7)	0 (0-20.1)	0 (0-2.8)

^aMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 * difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05
⁺ difiere con el grupo control AIS-VEH p<0.01; ⁺ difiere con el grupo control AIS-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"
⁺⁺ difiere con el grupo control AIS-VEH p<0.001 ⁺⁺⁺ difiere con el grupo control AIS-VEH p<0.001 ; * Difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"
^bMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 ⁺⁺ difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.01 en Mann-Whitney "U"
^cMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 ⁺⁺ difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05 * difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"
^dMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 ⁺ difiere con el grupo control AIS-VEH p<0.05 * difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"
^eMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 ⁺ difiere con el grupo control AIS-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"
^fMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.01 * difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"
^gMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.01 * difiere con el grupo control AIS/GR-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"

Los resultados muestran que el tratamiento experimental influyó significativamente en el cuidado corporal ($p < 0.001$). El test de Mann-Whitney indicó que la dosis más alta de bupropión (40 mg/kg) administrada a los ratones en las dos modalidades de alojamiento (AIS-BUP40; AIS/GR-BUP40) disminuyó el tiempo dedicado a esta conducta, en comparación con los vehículos (AIS-VEH) y (AIS/GR-VEH) ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). La dosis de 20 mg/kg de bupropión en ambos tipos de alojamiento (AIS-BUP20 y AIS/GR-BUP20) también redujo el tiempo dedicado al cuidado corporal en comparación con sus respectivos vehículos (AIS-VEH) ($p < 0.05$) y (AIS/GR-VEH) ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas en el tiempo dedicado a escarbar ($p < 0.001$). El post hoc indicó que las dosis de 40 y 20 mg/kg de bupropión administrada a los ratones en ambas modalidades de alojamiento (AIS-BUP40; AIS-BUP20; AIS/GR-BUP40; AIS/GR-BUP20) disminuyó el tiempo dedicado a esta conducta, en comparación con los respectivos vehículos (AIS-VEH) y (AIS/GR-VEH) ($p < 0.01$ y $p < 0.05$).

En la conducta de exploración no social se hallaron diferencias significativas ($p < 0.001$). La dosis de 40 mg/kg de bupropión administrada a los ratones alojados en primer lugar aislados y después agrupados (AIS/GR-BUP40), aumentó el tiempo dedicado a esta conducta, en comparación con el grupo control (AIS/GR-VEH) ($p < 0.01$) y respecto a la misma dosis pero diferente alojamiento AIS-BUP40 ($p < 0.05$). El tratamiento también influyó en exploración social ($p < 0.01$). La dosis de 40 mg/kg de bupropión administrada a los ratones alojados en ambas modalidades (AIS-BUP40; AIS/GR-BUP40) redujo el tiempo dedicado a esta conducta en comparación con sus vehículos (AIS-VEH) (AIS/GR-VEH) ($p < 0.05$) (ver figura 8.1).

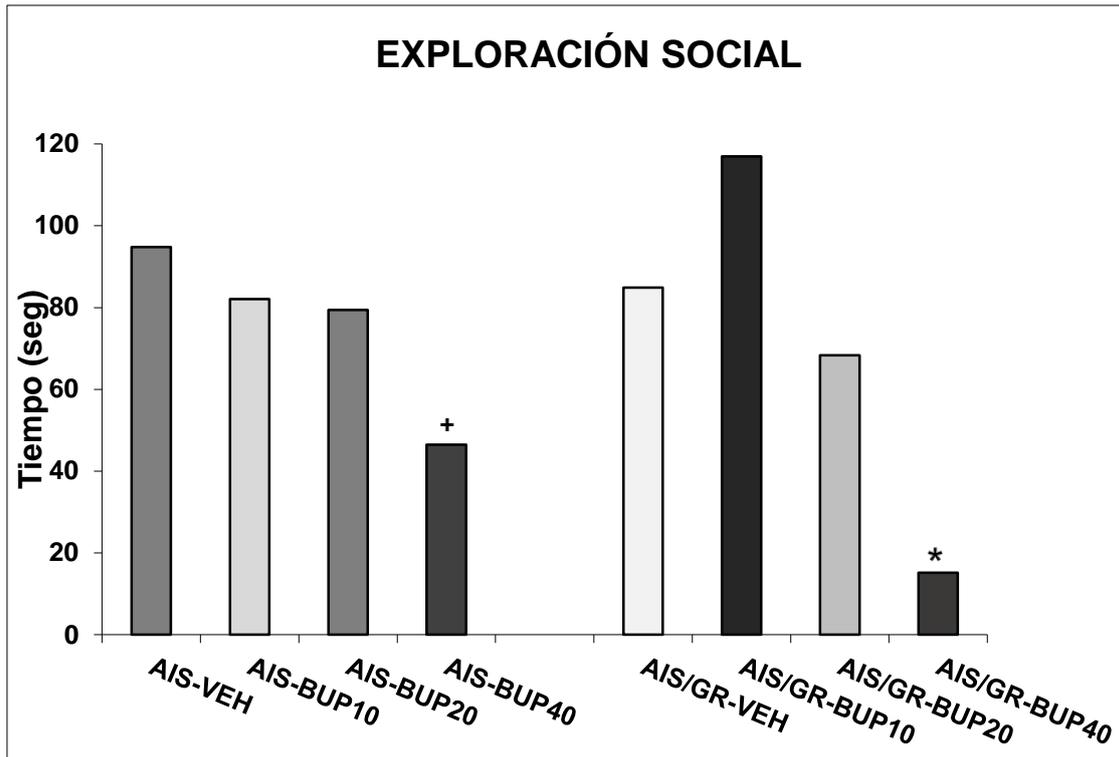


Figura 8.1. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a exploración social en las modalidades de alojamiento de aislado y aislados/agrupados.

+ $p < 0.05$ AIS-BUP40 vs AIS/VEH

* $p < 0.05$ AIS/GR-BUP40 vs AIS/GR-VEH

El Kruskal-Wallis mostró que las diferencias en el tiempo dedicado a la conducta de amenaza fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Las pruebas a posteriori indicaron que el tratamiento con la dosis más baja de bupropión (BUP10) administrada a los ratones aislados incremento el tiempo dedicado a la amenaza en comparación con su grupo control ($p < 0.05$). Así mismo, los grupos (AIS-BUP10; AIS-BUP20 y AIS-BUP40) incrementaron el tiempo dedicado a la amenaza en comparación con los grupos alojados en primer lugar aislados y después agrupados en la misma dosis (AIS/GR-BUP10 y AIS/GR-BUP20) ($p < 0.01$) (AIS/GR-BUP40) ($p < 0.05$). Los análisis también resultaron significativos en el tiempo dedicado a la categoría de ataque ($p < 0.001$), observándose que las tres dosis de bupropión 10, 20 y 40 mg/kg administradas a los ratones aislados (AIS-BUP10 AIS-BUP20 y AIS-BUP40) incrementaron el ataque respecto a sus mismos grupos en la diferente modalidad de alojamiento (AIS/GR-BUP10, AIS/GR-BUP20 y AIS/GR-BUP40) ($p < 0.05$).

Las diferencias en la latencia de ataque también alcanzaron la significación estadística ($p < 0.01$). Las dosis de bupropión de 10 y 20 mg/kg administradas a los ratones aislados (AIS-BUP10 y AIS-BUP20) aumentaron la latencia de ataque respecto a sus mismos grupos en la diferente modalidad de alojamiento (AIS/GR-BUP10 y AIS/GR-BUP20) ($p < 0.05$). Respecto al tiempo dedicado a evitación/huida se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se observó un incremento en la conducta de evitación/huida en los ratones AIS/GR-BUP40 respecto al grupo AIS/GR-VEH ($p < 0.05$). El tiempo dedicado a las conductas de defensa/sumisión ($p < 0.01$) también fue sensible al tratamiento experimental. Los grupos AIS/GR-BUP20 y AIS/GR-BUP40 pasaron más tiempo en esta conducta que el grupo control (AIS/GR-VEH) ($p < 0.05$).

Efectos del bupropión en ratones agrupados- agrupados/aislados

Las conductas que resultaron estadísticamente significativas en estos grupos fueron: cuidado corporal, escarbar, exploración no social, exploración a distancia, exploración social, amenaza, latencia de ataque y ataque (ver Tabla 8.2)

El análisis de Kruskal-Wallis reveló que el tratamiento influyó significativamente en el tiempo dedicado al cuidado corporal ($p < 0.001$). El test de Mann-Whitney indicó que las dosis de 20 y 40 mg/kg de bupropión administrada a los ratones a las dos modalidades de alojamiento, de forma que los grupos (GR-BUP40; GR/AIS-BUP40) disminuyeron el tiempo dedicado a esta conducta respecto a (GR-VEH y GR/AIS-VEH) ($p < 0.01$). Del mismo modo GR-BUP20 y GR/AIS-BUP20 dedicaron menos tiempo al aseo en comparación con los vehículos (GR-VEH y GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente). La dosis de 10 mg/kg de bupropión en la modalidad de agrupados disminuyó el tiempo dedicado al cuidado corporal en comparación con su vehículo (GR-VEH) ($p < 0.05$).

El análisis de la conducta de escarbar mostró diferencias entre los grupos ($p < 0.001$). El post hoc indicó que la dosis de 40 mg/kg de bupropión administrada a los ratones en ambas modalidades de alojamiento (GR-BUP40; GR/AIS-BUP40) disminuyó el tiempo dedicado a esta conducta, en comparación con los vehículos (GR-VEH) ($p < 0.01$) y (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$), respectivamente. Asimismo, la dosis de 20

mg/kg de bupropión en los ratones agrupados (GR-BUP20) disminuyó el tiempo dedicado a escarbar en comparación con su vehículo (GR-VEH) ($p < 0.05$). Para finalizar los ratones tratados con vehículo en la modalidad de agrupados (GR-VEH) realizaron más veces dicha conducta en comparación con los que se modificó el alojamiento (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$).

Tabla 8.2. Tiempo en medianas (rango) entre parentesis que dedican los ratones adultos a cada categoría conductual en las modalidades de alojamiento agrupados y agrupados aislados.

	AGRUPADOS					AGRUPADOS/AISLADOS				
	GR-VEH	GR-BUP10	GR-BUP20	GR-BUP40	GR/AIS-VEH	GR/AIS-BUP10	GR/AIS-BUP20	GR/AIS-BUP40	GR/AIS-VEH	GR/AIS-BUP40
Cuidado corpora^a	17.1 (6.6-27.7)	10.25 ⁺ (0.47.3)	3.1 ⁺ (0.5-20.2)	1.2 ⁺⁺ (1-10)	12.6 (5.2-21)	7.4 (3.6-9.5)	1.6 ^{**} (0.3-12.5)	2.4 ^{**} (0.3-9.5)		
Escarbar^b	16.1 (2-120.8)	21.55 (1.2-71.7)	5.2 ⁺ (1.1-24.5)	3 ⁺⁺ (1-9)	16.1 (0-120)	11.9 (3.2-81.1)	3.1 (0-13.2)	4.1 [*] (0.4-12.6)		
Exploración no social^c	460.5 (382.6-554.3)	448.4 (299.4-555.4)	476.1 (420.3-548.2)	540.6 (510-577)	386 (239.6-500)	422.5 (358.7-490.6)	402.2 (183-470.7)	476.4 [*] (231.4-555)		
Exploración a distancia	6.8 (0.3-15)	4.3 (0-19.1)	8.7 (0.7-22.9)	13.25 (3-22)	16.1 (2.6-37.6)	10.6 (3.2-79.9)	12 (1.2-24.1)	20.8 (8.1-42.6)		
Exploración social^d	95.6 (11.6-132.8)	67.35 (32.8-276.1)	74.7 (21.7-117.4)	31.2 (8-70)	101.9 (47.5-171.1)	69.6 (29.7-180.3)	94.7 (24-273.3)	49.5 [*] (2.4-336.7)		
Amenaza	0 (0-9)	0 (0-19.4)	0 (0-24.2)	0 (0-12)	18.1 (0-71.3)	24.6 (0-38.2)	20.4 (0.2-79.1)	3.5 (0-55.3)		
Ataque	0 (0-7.2)	0 (0-10.3)	0 (0-25.2)	0 (0-5)	18.3 (0-202.4)	3.9 (0-36.9)	33.6 (0-187.9)	0 (0-54.9)		
Latencia de ataque	600 (424-600)	600 (212-600)	600 (193-600)	600 (456-600)	600 (87-600)	600 (429-600)	600 (140-600)	600 (26.4-600)		
evitación/huida	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1.5)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.4)	0 (0-69.2)	0 (0-4.6)		
Defensa/sumisión	0 (0-2.5)	0 (0-9.3)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-1.4)	0 (0-100)	0 (0-6.8)		
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-120.7)	0 (0-3.4)	0 (0-26)	0 (0-0.5)	0 (0-39.8)	0 (0-5.8)	0 (0-25.2)		

^aMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001 ⁺⁺ difiere con el grupo control GR-VEH p<0.01; ⁺ difiere con el grupo control GR-VEH p<0.05

^b** difiere con el grupo control GR/AIS-VEH p<0.01 en Mann-Whitney "U"

^cMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001

^dDifere con el grupo control GR/AIS-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"

^eMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.001

^fMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.05

^g** difiere con el grupo control GR/AIS-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"

^hMuestra una varianza significativa en el Kruskal-Wallis apartir de p<0.05

ⁱ** difiere con el grupo control GR/AIS-VEH p<0.05 en Mann-Whitney "U"

Los resultados fueron estadísticamente significativos en la categoría de exploración no social ($p < 0.001$). El grupo de GR/AIS-BUP40 mostró más exploración no social que su vehículo (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$). Además, el tratamiento con las dosis de 20 y 40 mg/kg de bupropión administrada a los ratones agrupados (GR-BUP20 y GR-BUP40) aumentó el tiempo dedicado a esta conducta en comparación con los animales tratados con las mismas dosis pero con distinta modalidad de alojamiento (GR/AIS-BUP20 y GR/AIS-BUP40) ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente).

Respecto a la categoría conductual de exploración social los resultados indican que el tratamiento influyó de forma significativa en esta conducta ($p < 0.05$). La dosis más alta de bupropión (40 mg/kg) administrada a los ratones agrupados en primer lugar y después aislados (GR/AIS-BUP40), disminuyó el tiempo dedicado a esta conducta, en comparación con el grupo GR/AIS-VEH ($p < 0.05$) (ver figura 8.2).

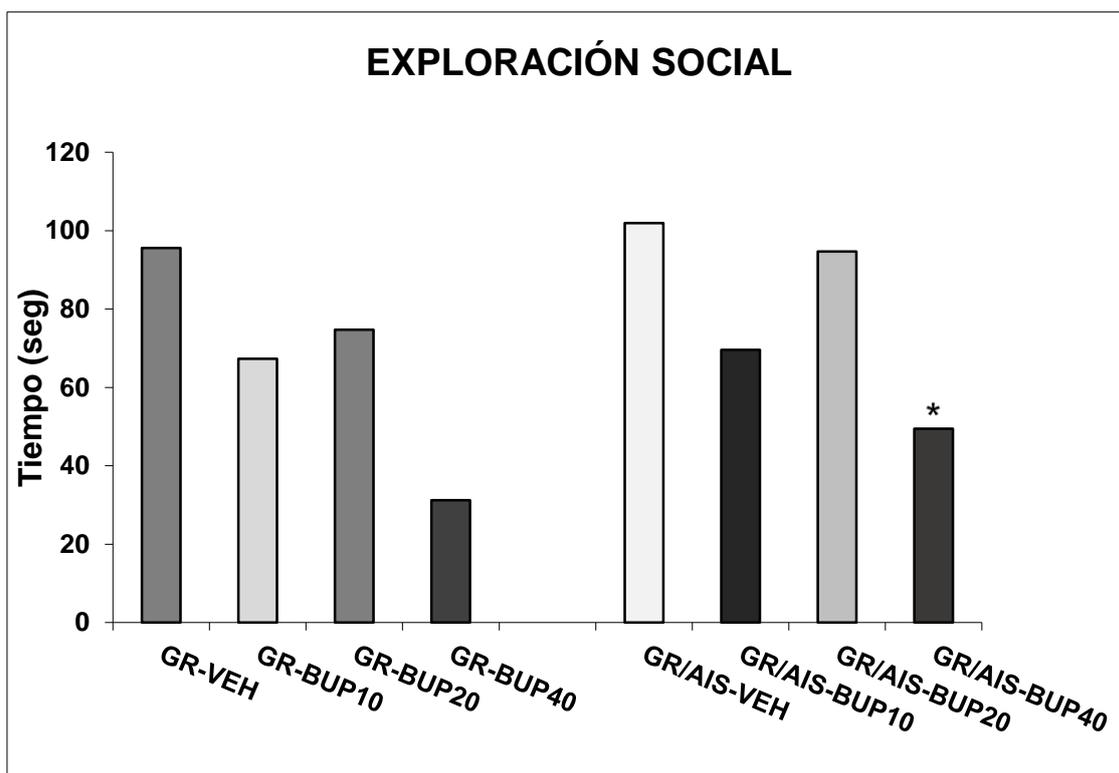


Figura 8.2. Los datos se representan en medianas del tiempo dedicado a Exploración social en las modalidades de alojamiento de agrupado y agrupado/aislados.

* $p < 0.05$ GR/AIS-BUP40 vs GR/AIS-VEH

Los análisis también detectaron diferencias significativas en el tiempo dedicado a la exploración a distancia ($p < 0.005$). Los ratones tratados con vehículo en la modalidad de agrupados (GR-VEH) realizaron menos exploración a distancia que el grupo (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$). Igualmente, el tratamiento influyó significativamente en el tiempo dedicado a la amenaza ($p < 0.001$). El test de Mann-Whitney indicó que las dosis de 40 mg/kg de bupropión administrada a los ratones agrupados (GR-BUP40) disminuyó el tiempo dedicado a esta conducta en comparación con su mismo grupo en la modalidad de alojamiento modificado (GR/AIS-BUP40) ($p < 0.05$). Además, los ratones agrupados tratados con vehículo (GR-VEH) realizaron menos veces dicha conducta en comparación con los que se modificó el alojamiento (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$).

La conducta de ataque mostrada por los animales resultó ser sensible al tratamiento experimental ($p < 0.001$). El post hoc indicó que la dosis intermedia de bupropión (20 mg/kg) en la modalidad de agrupados (GR-BUP20) disminuyó el tiempo dedicado al ataque en comparación con su mismo grupo pero en diferente modalidad de alojamiento (GR/AIS-BUP20) ($p < 0.05$). Asimismo, los agrupados tratados con vehículo (GR-VEH) realizaron menos veces dicha conducta en comparación con los que se modificó el alojamiento (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$).

Finalmente la latencia de ataque también fue significativa ($p < 0.01$). El post-hoc mostró que los ratones agrupados tratados con vehículo (GR-VEH) tuvieron una mayor latencia de ataque en comparación con el vehículo de la otra modalidad de alojamiento (GR/AIS-VEH) ($p < 0.05$).

Por último, el análisis de Kruskal-Wallis indicó que no hubo diferencias significativas entre los grupos en las categorías de evitación/huida y defensa/sumisión. Las medianas en inmovilidad fueron 0 en todos los grupos y no se obtuvieron diferencias significativas en el análisis de Kruskal-Wallis.

4.DISCUSIÓN

La conducta agresiva no es un proceso unitario, ya que es el resultado de interacciones complejas entre varios factores fisiológicos, motivacionales y de comportamiento (Nelson y Trainor, 2007). Aunque el aislamiento social es el método más frecuentemente utilizado en el laboratorio para inducir agresión en ratones (Matsumoto y cols., 2007; Miczek y cols., 2002) en el presente estudio, los ratones fueron alojados también en grupo, que son las condiciones bajo las cuales los ratones OF1 suelen mostrar niveles más bajos de conducta agresiva (Estelles y cols., 2004).

Los resultados obtenidos en la presente investigación son complejos debido al elevado número de grupos evaluados, ya que se han realizado análisis comparativos de los efectos en la conducta agonística entre grupos que recibieron tratamiento farmacológico con diferentes dosis de bupropión o suero fisiológico combinado con diferentes modalidades de alojamiento. Es importante remarcar que éste es el primer estudio en que se evalúa el efecto del bupropión, considerando cuatro modalidades de alojamiento y llevados a cabo en diferentes momentos de la adolescencia (temprana y tardía). Así, en este estudio los grupos de animales alojados bien en grupo o bien individualmente durante su adolescencia temprana se desdoblaron para cambiar a otra condición de alojamiento en la adolescencia tardía.

Los datos indican que la administración aguda de bupropión ha tenido efectos significativos especialmente en las categorías que miden la agresividad (amenaza y ataque). Con el fin de hacer una descripción más detallada de estos datos se discutirán por separado los resultados obtenidos en cada una de las categorías de alojamiento iniciales.

- 1) Animales que permanecen en la categoría inicial de “Aislados” y posteriormente son mantenidos en aislamiento o alojados en grupo.

Nuestros resultados indican un aumento del tiempo dedicado a la amenaza y el ataque y una disminución de la latencia de ataque en los animales que permanecieron aislados a lo largo de todo el experimento, respecto a sus congéneres que estuvieron primero aislados y después agrupados y recibieron idéntico tratamiento, aunque estas diferencias no se mantuvieron respecto a su grupo control.

Este dato sugiere que el efecto pro-agresivo se debe a la combinación del tratamiento farmacológico con factores ambientales. Es de destacar que únicamente el tratamiento con la dosis más baja de bupropión (10 mg/kg) incrementó el tiempo de amenaza en comparación con su grupo control. En cambio, observaciones anteriores registradas en nuestro laboratorio mostraron un aumento en el tiempo de ataque tras la administración aguda de bupropión (10 o 40 mg/kg) después de un período de aislamiento social, pero este aumento sólo alcanzó la significación estadística en los ratones que mostraban un bajo nivel basal de agresividad (Redolat y cols., 2005). Dicha disparidad de resultados pueden ser debidas a la diferencia de tiempo en aislamiento y al periodo evolutivo en que se inicio este tipo de alojamiento.

El grupo que estuvo en primer lugar aislado y luego agrupado mostró medianas de cero en amenaza y ataque. Esta potente acción antiagresiva fue acompañada de un aumento en conductas de evitación/huida y defensa/sumisión. Cuando evaluamos el tratamiento farmacológico encontramos que la dosis de 20 mg/kg aumentó la defensa y la dosis de 40 mg/kg incrementó tanto la defensa como la evitación y ambas dosis disminuyeron las conductas que miden el cuidado corporal y escarbar. Tanto el aumento en la conducta defensiva como la disminución del tiempo dedicado al cuidado corporal y escarbar han sido consideradas como un indicador fiable de la actividad ansiogénica de los fármacos (Navarro y cols., 2004).

Una posible explicación al incremento del tiempo dedicado a las conductas de ofensa en los ratones aislados respecto a los aislados/agrupados podría ser atribuida a las diferentes condiciones experimentales, confirmando lo obtenido en algunas investigaciones que sugieren cambios en el patrón conductual cuando el animal se somete al test de interacción social después de estar en un entorno socialmente desfavorecido (aislados) o bien tras haber sido realojados en diferentes condiciones ambientales a las iniciales (Lukkes y cols., 2009; Whitaker y cols., 2013). Las investigaciones llevadas a cabo por Lukkes y colaboradores (2009) revelan que cuando las ratas son aisladas en el día postnatal 21 hasta el 42 y resocializadas posteriormente exhiben mayor ansiedad e impulsividad (Baarendse y cols., 2013), lo que sugiere que el aislamiento durante la adolescencia temprana seguido de alojamiento en grupo durante el resto de la adolescencia es suficiente para causar conductas desadaptativas. Nuestros hallazgos confirman que el tratamiento con

bupropión en ratones que fueron aislados en la adolescencia temprana pero realojados en la adolescencia tardía incrementó las conductas defensivas sugiriendo un perfil ansiogénico del bupropión que únicamente se manifiesta en los animales con un preexistente déficit social en la adolescencia temprana. En cambio, el tratamiento con la dosis más baja de bupropión (10 mg/kg) en los ratones que permanecen aislados muestra un efecto proagresivo pero únicamente en aquellos ratones con un elevado nivel de agresividad basal. Otros estudios revelan resultados inconsistentes al valorar los efectos de otros antidepresivos como la fluoxetina o sertralina sobre la agresión en ratas y ratones mantenidos en diferentes condiciones de alojamiento (Gunther, 2008). En un meta-análisis realizado con antidepresivos ISRS también encontraron diferentes efectos sobre la agresividad dependiendo de la edad de los animales o de las condiciones de alojamiento (ver revisión de Carrillo y cols., 2009).

Por otro lado, el tratamiento con la dosis más alta de bupropión disminuyó la conducta de exploración social en los ratones aislados/agrupados sugiriendo nuevamente un perfil ansiogénico. El incremento de exploración no social en el grupo aislado/agrupado tratado con la dosis de 40 mg/kg podría atribuirse a la disminución del tiempo dedicado por estos animales a explorar desde una distancia al oponente, amenazarlo o atacarlo, aunque también podría haber influido el incremento de la actividad motora producida por el fármaco.

2) Animales que permanecen en la categoría inicial de “Agrupados” y posteriormente son mantenidos en grupo o alojados en aislamiento.

Uno de los resultados más interesantes obtenidos tras la modificación del alojamiento en la adolescencia tardía es que aumentó la conducta de exploración a distancia, la amenaza, el ataque y la latencia de ataque en los ratones que fueron agrupados en primer lugar y después aislados en comparación con los que siempre permanecieron agrupados *tras ser* tratados con suero fisiológico, sin afectar significativamente a las conductas defensivas. Este resultado podría interpretarse en el sentido de que el simple manejo de los animales para la administración de las inyecciones altera sus respuestas en el test de agresión.

La modalidad de alojamiento con bupropión mostró efectos proagresivos en los animales que inicialmente fueron agrupados y luego aislados (agrupados/aislados) respecto a los que siempre permanecieron agrupados. De modo que el tratamiento con la dosis media de bupropión (20mg/kg) en el grupo de agrupados/aislados aumentó la amenaza y la dosis más alta (40mg/kg) incrementó el ataque en comparación con las mismas dosis pero en la condición de agrupados, sugiriendo que la modalidad de alojamiento modula la conducta agresiva en los encuentros agonísticos. En cambio, el tratamiento o la modalidad de alojamiento no afectó a las medianas en las categorías de evitación/huida y defensa/sumisión en el grupo que permaneció siempre agrupados, por lo que no se advirtieron claros efectos antiagresivos.

Otro aspecto de interés a resaltar en la presente investigación es el relativo a los cambios que se observan en otras categorías durante los encuentros sociales, tales como el cuidado corporal (incluyendo el autoaseo, aseo abreviado, rascarse y lavado). En roedores, el autoaseo es una compleja respuesta etológica que parece ser muy sensible a los factores endógenos y exógenos (Kalueff y cols., 2004). Nuestros resultados revelan que, independientemente de la modalidad de alojamiento, hay una disminución en el tiempo dedicado al cuidado corporal en los ratones tratados con la dosis alta e intermedia de bupropión de 20 y 40 mg/kg en los agrupados/aislados y con todas las dosis en los animales agrupados. Dichos datos confirman estudios previos de nuestro laboratorio que indican que esta categoría conductual es una de las más afectadas por la administración de bupropión en los encuentros agonísticos entre ratones (Redolat y cols., 2005).

Durante los encuentros sociales con ratones, el aumento de la conducta de escarbar y la reactividad a los entornos desconocidos se ha observado con frecuencia después de la administración de ansiolíticos (Cutler, 1994), aunque algunos autores sugieren que dicha conducta no tiene ninguna relación directa con la ansiedad (Masuda y cols., 2000) o la agresión (Sluyter y cols., 1996). Por el contrario, en las pruebas en las que los ratones se enfrentan con un estímulo aversivo, como "marble burying" o "defensive burying", el aumento en escarbar es interpretado como un efecto ansiogénico (De Boer y Koolhaas, 2003). En el presente estudio el bupropión produjo una disminución en dicha conducta en los ratones tratados con las dosis de bupropión (40 mg/kg) en las dos modalidades de alojamiento y con la dosis intermedia en el caso de

los agrupados. Aunque dicho dato es difícil de interpretar, sugiere que la administración de dosis altas e intermedias de bupropión puede tener un efecto ansiogénico.

Los análisis comparativos entre agrupados y agrupados/aislados indican que la administración aguda de la dosis alta de bupropión (40 mg/kg) disminuyó la exploración social en el grupo agrupados/aislados, sugiriendo nuevamente que el tratamiento con la dosis más alta tuvo efectos ansiogénicos (Redolat y cols., 2005).

También se compararon en estas dos modalidades de alojamiento los comportamientos exploratorios tanto hacia el ambiente como al oponente (evaluados en la categoría de exploración no social y exploración a distancia). Los datos obtenidos indican que la exploración no social aumentó tras la administración de la dosis más alta de bupropión (40 mg/kg) en la combinación de la modalidad de alojamiento agrupados/aislados con respecto a su control. Estudios previos sugieren que el aumento del tiempo dedicado a exploración no social está fuertemente influenciado por los cambios en la locomoción (Redolat y cols., 2005). No obstante, el tratamiento con las dosis de 20 y 40 mg/kg en los animales que permanecieron siempre agrupados también aumentaron el tiempo dedicado a esta conducta en comparación con los animales tratados con la misma dosis pero que permanecieron en distinta modalidad de alojamiento, por lo que además del efecto motor propio del tratamiento con bupropión, también se advierte la influencia de las condiciones en las que los animales permanecen alojados durante el experimento.

En general, los datos obtenidos en este último experimento parecen indicar, que la modalidad en que son alojados los ratones y el periodo evolutivo en el que se hacen modificaciones ambientales tienen efectos en la conducta agonística. Hemos estudiado los cambios de comportamiento inducidos tras el tratamiento agudo de bupropión advirtiéndose efectos tanto pro-agresivos medidos a través del incremento de la amenaza con la dosis más baja de bupropión en la modalidad de aislados como antiagresivos en el grupo de aislados/agrupados (medido en el incremento de conducta de huida y defensa). Aunque la interpretación de los resultados resulta compleja debido al diseño experimental utilizado, el presente estudio evidencia la importancia de evaluar los efectos de los fármacos teniendo en cuenta los factores ambientales y la edad de los animales a la hora de esclarecer las propiedades farmacológicas y las acciones conductuales del bupropión.

IV.-DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Las manipulaciones farmacológicas con modelos animales tienen una larga tradición en la investigación sobre aspectos como la cognición, la búsqueda de novedad, la ansiedad, la irritabilidad y la agresión. En la presente investigación nuestro objetivo general fue evaluar el perfil cognitivo y emocional del bupropión aplicando diferentes modelos animales. Con este fin se ha valorado la influencia de este fármaco sobre la capacidad de aprendizaje y memoria implícita y explícita, así como sus efectos sobre la exploración o búsqueda de novedad, la ansiedad y la conducta de interacción social. Además, se examinó cómo afecta el tratamiento agudo con bupropión, nicotina o la administración conjunta de ambos fármacos sobre las conductas emocionales anteriormente señaladas. Igualmente, en el paradigma de agresión se realizaron manipulaciones ambientales con el fin de constatar si el bupropión tiene efectos progresivos cuando se modifican las condiciones de alojamiento. Por último, en esta investigación se compararon los efectos del tratamiento en ratones adolescentes y adultos con el objetivo de valorar si existen diferencias entre ambos grupos de edad en los efectos inducidos por este fármaco a nivel conductual. En esta discusión general se integran los tres estudios incluidos en esta Tesis Doctoral.

1.- Efectos del tratamiento con bupropión en tareas de aprendizaje

En el estudio I de la presente investigación se valoró el efecto del bupropión en tareas de aprendizaje (condicionamiento de evitación activa y aprendizaje espacial en el laberinto de agua) con el fin de evaluar si este fármaco muestra efectos procognitivos, tal y como han sugerido otros autores (Carmack y cols., 2014).

Se sabe que el déficit de la memoria es común durante la depresión, tras el uso de psicoestimulantes o como consecuencia de trastornos neurodegenerativos. Además, es conocido que la modulación de neurotransmisores en el hipocampo y el córtex cerebral desempeña un papel fundamental en el funcionamiento cognitivo (Logue y Gould, 2014). Diversas investigaciones realizadas con antidepresivos como la duloxetina han encontrado que este fármaco puede revertir los déficits cognitivos observados en ratones (Gregoire y cols., 2012). En cambio, otras investigaciones con el mismo antidepresivo pero empleando el paradigma del laberinto de agua y el laberinto

elevado en forma de cruz no encontraron efectos beneficiosos en dichas tareas cognitivas (Kale y cols., 2014).

En roedores, el tratamiento con bupropión mejoró la memoria a largo plazo en una tarea de aprendizaje pavloviano del miedo (Carmack y cols., 2014). Esta mejora cognitiva fue similar a la observada en los animales que fueron tratados con el psicoestimulante metilfenidato, que es utilizado como un potenciador cognitivo para una amplia diversidad de trastornos, en particular en el tratamiento del TDHA (Carmack y cols., 2014). En los experimentos 1 y 2 de la presente Tesis se observa que el tratamiento con bupropión no tuvo efectos deletéreos en las tareas de aprendizaje en ratones adultos. De hecho, en la tarea de evitación activa este fármaco mejoró la capacidad de aprendizaje de los ratones adultos cuando se les administraron las dosis de 10 y 20 mg/kg. Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Kruk y colaboradores en 2011 empleando las mismas dosis. Estos autores confirmaron que la nicotina mejoraba la memoria y los procesos de aprendizaje y que el tratamiento con bupropión atenuaba tanto la mejora inducida por la nicotina como los trastornos en la memoria inducidos por escopolamina, hipotetizando que el mecanismo de acción del bupropión en relación con la memoria podría ser resultado de la interacción entre receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChRs). Otros estudios, en cambio, han hallado que dosis altas de bupropión (40 mg/kg) pueden causar deterioro en la memoria, especialmente en la adquisición y expresión de recuerdos contextuales (Portugal y Gould, 2007).

Por otro lado, tanto en sujetos humanos como en modelos animales se han encontrado alteraciones relacionadas con la edad en el control de la motivación, la afectividad y a nivel cognitivo que van a influir en la forma de elaborar y responder al entorno y a las recompensas. La adolescencia es una época caracterizada por grandes cambios a nivel hormonal, neuronal, psicosocial y conductual. Los cambios en la reorganización estructural y funcional del cerebro en los adolescentes actúan en paralelo a las alteraciones conductuales, influyendo tanto en los déficits como en las posibles mejoras. El cerebro de los adolescentes madura a través de una prolongada reorganización de la sustancia gris, la sustancia blanca y cambios en los diferentes sistemas de neurotransmisores. Se ha descrito que el desequilibrio en la maduración del sistema emocional y de recompensa se centraría en el área subcortical mientras que el

sistema ejecutivo y de control de los impulsos dependería más de áreas corticales (Smith, 2013). De este modo, se sugiere que estas áreas estarían relacionadas con el incremento en las conductas de riesgo mostrado por los adolescentes, especialmente cuando se encuentran en determinados entornos sociales (Smith, 2013).

Un segundo objetivo de la presente investigación fue evaluar si la edad afectaba a la memoria espacial en ratones. Investigaciones previas han comparado la ejecución en este laberinto entre ratones viejos y adultos, encontrando que los primeros aprenden las tareas más lentamente (Vicens y cols., 2003). Los resultados obtenidos en el presente trabajo reflejan también diferencias significativas en la tarea espacial entre los diferentes grupos de edad evaluados: se observó que los adolescentes requirieron más tiempo para encontrar la plataforma, condicionando de esta forma la tarea de adquisición. Igualmente, los hallazgos encontrados aportan información al comparar los efectos del tratamiento con bupropión en el laberinto de agua, indicando que el tratamiento con bupropión no tuvo un efecto perjudicial sobre la adquisición o retención de la tarea espacial en ratones adultos NMRI, pero sí deterioraba la adquisición en los adolescentes. Otras investigaciones también confirman que el aprendizaje espacial *per se* no se ve afectada por el tratamiento con bupropión o con citalopram (antidepresivo) en ratones adultos (Neumeister y Riepe, 2012). Nuestros resultados sugieren que el bupropión produce diferentes efectos sobre el aprendizaje según la edad a la que se ven expuestos los animales, mostrando los adolescentes un ligero deterioro respecto a los adultos.

Es importante destacar que hay autores que señalan que nadar en el laberinto de agua supone un factor físico estresante para el animal (Holder y Blaustein, 2014). Además de las variaciones naturales en el rendimiento de tareas cognitivas, atribuibles a la edad o al estadio de desarrollo (Esmoris-Arranz y cols., 2008), los factores de estrés agudo experimentados durante la adolescencia también contribuyen a las deficiencias observadas a nivel cognitivo (Tsoory y cols., 2007). Las variables físicas (restricciones de comida, shock en las patas, privación del sueño) incrementan el estrés en la adolescencia dando lugar a un deterioro en la ejecución del laberinto de agua de Morris (ver revisión Holder y Blaustein, 2014). Es posible que en nuestro trabajo, los ratones adolescentes se hayan visto más afectados que los adultos por el componente del estrés físico que supone nadar en la piscina, con el consiguiente deterioro en la ejecución de la tarea.

2.- Efectos del bupropión, la nicotina y la co-administración de ambos fármacos sobre la conducta de búsqueda de novedad y ansiedad

Otras conductas que difieren entre roedores adolescentes y adultos son las asociadas a la ansiedad, la búsqueda de la novedad y la respuesta al estrés. Los adolescentes buscan situaciones novedosas y asumen más riesgo que los adultos (Steinberg, 2007). En el presente estudio, empleamos la tabla de agujeros o *hole board* que permite valorar el nivel de exploración y la búsqueda de novedad y el laberinto elevado en forma de cruz, un modelo de ansiedad basado en el miedo del animal cuando se encuentra en los brazos no protegidos del laberinto. Nuestras observaciones indican que los ratones adolescentes exploran más, tal como sugieren los resultados obtenidos en el *hole board*, y son menos ansiosos que los adultos, tal y como refleja la conducta registrada en el paradigma de *plus maze*. Otras investigaciones también han puesto de manifiesto que las ratas adolescentes exhiben un aumento de las interacciones sociales, la búsqueda de novedad y el consumo de alcohol en comparación con adultas (Spear 2000, 2007; Doremus y cols., 2005). En cambio, Hefner y Holmes (2007) encontraron que los ratones adolescentes mostraron menos actividad exploratoria que los adultos (utilizando el laberinto elevado en forma de cruz y el campo abierto).

Es bien conocido que los psicofármacos pueden modificar las respuestas de búsqueda de novedad y ansiedad en roedores. Además, dicho patrón de afrontamiento ante un ambiente desconocido puede verse modificado en función de la edad a la que son administrados los fármacos. En investigaciones anteriores sobre los efectos del bupropión sobre la ansiedad se han obtenido resultados contradictorios. Cuando se administra en la edad adulta, este fármaco ha demostrado tener un perfil ansiogénico (Comissaris y cols., 1990), ansiolítico (Biala y Kruk, 2009) o ningún efecto en el nivel de ansiedad en las conductas evaluadas a través del *plus maze* (Carrasco y cols., 2004; Redolat y cols., 2005a). Los resultados hallados en la presente investigación indican que la dosis más alta de bupropión (40mg/kg) disminuyó la búsqueda de novedad (medida a través del *hole board*) y que dicho tratamiento no tuvo efectos sobre la ansiedad (evaluada en el *plus maze*).

Se ha constatado que el cerebro en la adolescencia es muy sensible y vulnerable a los efectos de diferentes fármacos y drogas de abuso. Por ejemplo, el tratamiento con el antidepresivo fluoxetina en la adolescencia incrementa las conductas asociadas a la

ansiedad en comparación con los efectos observados en adultos, así como la probabilidad de sufrir enfermedades mentales a lo largo de la vida (Majidi-Zolbain y cols., 2013). En nuestro estudio se confirmó la mayor sensibilidad de los ratones adolescentes a la administración del antidepresivo bupropión: el tratamiento agudo con bupropión disminuyó la búsqueda de la novedad el *hole board* en este grupo de edad, indicando que este fármaco produce cambios en la actividad exploratoria, con una significativa reducción del *head-dipping*. La reducción de la actividad exploratoria sugeriría posibles alteraciones en el estado emocional de los ratones y reflejaría una disminución en la motivación para explorar nuevos ambientes. Uno de los resultados más destacados obtenidos en nuestra investigación es que dosis elevadas de bupropión parecen inducir efectos ansiogénicos en los adolescentes pero no tienen efectos en los adultos.

El presente trabajo no confirma las diferencias previamente descritas en la conducta de ansiedad entre ratones adolescentes y adultos tras el tratamiento agudo con bupropión (Carrasco y cols., 2013). Sin embargo, la disminución del número de *head dipping* en los adolescentes puede indicar que en esta edad los ratones muestran un perfil ansiogénico. Diferencias en el sistema dopaminérgico podrían explicar, al menos en parte, estas discrepancias entre la conducta observada en los animales adultos y la registrada en los adolescentes. El sistema dopaminérgico está implicado en la regulación de la ansiedad y las conductas de miedo así como en la adquisición y en la expresión de las respuestas de evitación (Jiao y cols., 2014) y se ha sugerido que las diferentes respuestas conductuales al bupropión en estos modelos conductuales podrían atribuirse a la implicación de diferentes áreas cerebrales (Jiao y cols., 2014). Los efectos diferenciales del bupropión en ratones adolescentes y adultos podrían estar relacionados con la maduración del sistema dopaminérgico en el cerebro, siendo más sensibles los adolescentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos (para una revisión, ver Galvan, 2010). Otros estudios han relacionado la disminución en los receptores dopaminérgicos D2 en el núcleo accumbens en los adolescentes con la búsqueda de sensaciones y las conductas que reflejan disminución de la ansiedad (Falco y cols., 2014). Por el contrario, el deterioro en el control de los impulsos y en el aprendizaje asociativo coinciden con un pico de los receptores dopaminérgicos D1 en esta etapa del desarrollo (Garske y cols., 2013). Se podría hipotetizar que en nuestro estudio la

búsqueda de novedad en el *hole board* o la exposición a situaciones aversivas en el laberinto elevado pueden haberse visto más alteradas tras el tratamiento con bupropión en los ratones adolescentes en parte por los cambios dopaminérgicos inducidos por la administración de éste fármaco. Sin embargo, la complejidad de las acciones farmacológicas de este antidepresivo y los escasos estudios neurobiológicos en roedores adolescentes dificultan la comparación con los cambios observados en las investigaciones realizadas con ratones adultos.

Tal y como ha quedado expuesto en la descripción del experimento 3 en el presente trabajo se han evaluado también los efectos de la nicotina. Estudios previos han propuesto que la nicotina induce potentes efectos positivos sobre el estado de ánimo y la cognición, que contribuyen directamente al desarrollo de la adicción (Casarrubea y cols., 2015). En roedores, el consumo de nicotina de forma crónica produce diversos cambios en la actividad locomotora, las conductas asociadas a la ansiedad, el rendimiento cognitivo y en la autoadministración de nicotina (Adriani y cols., 2003; Thanos y cols., 2013). En nuestra investigación el tratamiento con nicotina en el experimento 3 redujo la búsqueda de novedad. Dichos datos sugieren que la disminución en el nivel de búsqueda de novedad podría asociarse a una menor curiosidad y a una menor tendencia a explorar un ambiente desconocido. Algunos autores han sugerido que los fármacos ansiogénicos inducen una reducción en el número de *head dipping* e incrementan la latencia al primer HD, mientras que los efectos contrarios se observan con fármacos ansiolíticos (Takeda y cols., 2005). En cambio, en los experimentos 4 y 5 no obtuvimos efectos significativos en esta conducta. Esta ausencia de resultados puede estar relacionada con el tamaño de la muestra debido a la amplia variabilidad individual cuando se evalúan parámetros conductuales en roedores.

El hecho de que la nicotina induzca efectos diferenciales sobre el nivel de ansiedad en roedores adolescentes y adultos sugiere una diferente sensibilidad a nivel conductual, neuroquímico y hormonal (Abreu-Villaça y cols., 2015). Nuestros datos confirman que la dosis más alta de nicotina disminuyó la búsqueda de novedad en los adultos y no tuvo efectos en adolescentes. Además, hallamos que el tratamiento agudo con nicotina induce efectos ansiolíticos en ratones adolescentes aumentando el tiempo que pasaban en brazos abiertos y el porcentaje de HD en el laberinto elevado. Estos

resultados apoyan la hipótesis de que los adolescentes son más vulnerables a los efectos de la nicotina, lo que puede llevar a un mayor consumo de cigarrillos.

El bupropión es un antidepresivo que alivia algunos de los síntomas de abstinencia de la nicotina, aunque sus efectos sobre la ansiedad no están totalmente claros. Se ha sugerido que la interacción entre bupropión y agonistas nicotínicos es compleja. Algunos estudios indican que el bupropión puede antagonizar ciertas acciones de la nicotina, al actuar como un antagonista no competitivo del nAChR (Slemmer y cols., 2000). Por ejemplo, en sujetos humanos el bupropión alivia los síntomas de abstinencia a la nicotina como la ansiedad y la irritabilidad. En estudios preclínicos también se ha evidenciado en ratones que el bupropión y sus metabolitos revierten los efectos asociados a la ansiedad en el periodo de abstinencia a la nicotina, disminuyendo tanto los síntomas físicos como afectivos (Damaj y cols., 2010). Otros estudios indican que el bupropión atenúa la tolerancia crónica a la nicotina en ratones (Grabus y cols., 2012). A raíz de estos estudios previos que apuntan una interacción entre bupropión y nicotina se consideró interesante evaluar si la interacción entre ambos fármacos (bupropión y nicotina) induce cambios sobre el nivel de ansiedad. Nuestros resultados indican que la co-administración de bupropión y nicotina disminuyó la búsqueda de novedad independientemente de la edad de los sujetos experimentales. Hay que tener en cuenta que en general, los adolescentes muestran una disminución en el nivel basal de ansiedad ante la exploración de un ambiente nuevo (Doresmus y cols., 2004). En este sentido, un segundo objetivo de este experimento fue constatar si la co-administración de bupropión y nicotina inducía un perfil ansiolítico en estos modelos animales. Nuestros datos confirman que la interacción entre ambos fármacos tuvo efectos ansiolíticos en los ratones adolescentes, pero no en los adultos. Este efecto aditivo de ambos fármacos ha sido descrito previamente en otras investigaciones con ratones adultos (Sidhapura y cols., 2007). Sin embargo, este posible efecto protector de nicotina y bupropión sobre la ansiedad no había sido evaluado previamente en ratones adolescentes. Se ha propuesto que los adolescentes pueden tener una sensibilidad diferencial a las propiedades gratificantes y a los síntomas de abstinencia de la nicotina en comparación con los adultos (Counotte y cols., 2009). Otros estudios que apoyan estos resultados indican que las ratas adolescentes se auto-administran niveles de nicotina más altos que los adultos (Levin y cols., 2003, 2007). Se puede hipotetizar que

las diferencias en la sensibilidad a la interacción entre nicotina y bupropión en adolescentes y adultos podrían explicar, al menos en parte, la ausencia de efectos en los adultos.

3. Efectos del tratamiento con bupropión, nicotina y su interacción sobre la conducta de interacción social en diferentes modalidades de alojamiento y edades.

Recientemente ha aumentado el interés sobre la influencia de los estimulantes sobre la conducta agresiva aunque hay que tener en cuenta que los efectos de los fármacos sobre la agresión son complejos y más difíciles de interpretar que en otros paradigmas (Blanchard y cols., 2003). La investigación en la que se manipulan las condiciones ambientales tiene una larga tradición en los encuentros agonísticos, encontrándose diferentes niveles de agresividad en función de la modalidad de alojamiento (ratones que permanecen agrupados vs aislados). En ratones, el aislamiento social incrementa la actividad motora y el nivel de agresividad (Burke y Miczek, 2014). Nuestro trabajo es el primer estudio que ha evaluado el efecto del bupropión, nicotina y su interacción en ratones mantenidos en diferentes tipos de alojamiento, intentando establecer además si estos efectos difieren con la edad.

Se ha sugerido que el procedimiento de aislar a los animales durante la adolescencia podría ir asociado a largo plazo a un deterioro de control de impulsos y la toma decisiones (Baarendse y cols. 2013). Nuestros resultados no confirman diferencias en la agresividad respecto a la edad pero sí corroboran que hay cambios en la emocionalidad entre adolescentes y adultos, produciéndose un incremento de las conductas asociadas a la ansiedad en los ratones adolescentes que fueron previamente aislados durante 15 días (reflejado en la disminución del tiempo dedicado a la exploración social y a la conducta de escarbar). Estos hallazgos confirman estudios recientes que indican que existen respuestas conductuales diferentes a los fármacos estimulantes en función de la edad a la que son expuestos los animales y de los factores ambientales (Baarendse y cols. 2013).

Estudios previos en nuestro laboratorio encontraron que en ratones OF1 que habían permanecido en aislamiento el bupropión mostraba efectos proagresivos, pero solo en aquellos que presentaban un bajo nivel de agresividad. En el presente trabajo los datos registrados del experimento 6 sugieren que la administración aguda de bupropión

no induce las propiedades pro-agresiva descritas previamente para los ratones alojados individualmente cuando los efectos de este fármaco se evalúan en sujetos que han permanecido alojados en grupo. El bupropión también disminuyó la conducta de escarbar y el cuidado corporal sin producir un claro incremento en la exploración social, lo que no confirmó el posible perfil ansiolítico del fármaco.

Investigaciones previas indican que el incremento en la irritabilidad que puede llevar a la agresión se relaciona con alteraciones en el sistema colinérgico e hiperactividad en el sistema límbico (Siever, 2008). Estudios realizados en distintas especies y utilizando diversos modelos animales sugieren que el tratamiento con agonistas del nAChR induce propiedades anti-agresivas (Levis y cols., 2015). No obstante, como hemos expuesto anteriormente, nuestra investigación no confirma los efectos antiagresivos de la nicotina. Esta sustancia no tuvo efectos significativos sobre el tiempo dedicado al cuidado corporal, escarbar, exploración social o agresión. Hay que señalar, sin embargo, que en estas investigaciones previas se habían utilizado diferentes paradigmas conductuales, cepas y distintas dosis de nicotina, lo que puede explicar la discrepancia en los resultados.

Podemos concluir que la evaluación etofarmacológica de la conducta de los ratones tratados de forma aguda con una combinación de bupropión y nicotina indica que la administración aguda de nicotina refuerza algunos de los efectos de la dosis más baja de bupropión, tales como la disminución en el cuidado corporal y de escarbar. De esta manera, nuestros datos confirman la complejidad de los cambios conductuales observados tras la administración aguda de bupropión y subrayan la importancia de emplear una amplia gama de procedimientos experimentales a fin de determinar las propiedades farmacológicas y acciones conductuales de este fármaco, solo o en combinación con nicotina.

Otro de los objetivos del presente trabajo (experimento 7) fue esclarecer si los efectos del bupropión y la nicotina diferían entre ratones adolescentes y adultos, puesto que el aislamiento social en las etapas tempranas del desarrollo tiene profundas consecuencias en el comportamiento social del adulto (Ferrari y cols., 1997). Con este objetivo, hemos comparado los cambios de comportamiento inducidos tras un período de aislamiento de 15 días en ratones adolescentes y adultos. Al interpretar los resultados obtenidos es importante tener en cuenta que el efecto de aislamiento podría depender de

la edad del sujeto en el momento en que fue aislado (Matsumoto y cols., 2012). Se ha sugerido que tanto la duración del período de aislamiento (Matsumoto y cols., 2012) como la edad a la que se inicia el aislamiento son factores relevantes al evaluar los efectos del alojamiento en la conducta (Burke y Miczek, 2015). Las diferencias en los efectos de los dos fármacos evaluados (nicotina y bupropión) en ratones adolescentes y adultos podrían estar relacionadas con el hecho de que el perfil conductual durante los encuentros sociales es diferente para cada grupo de edad. Por ejemplo, se ha informado que el comportamiento social de los roedores adolescentes difiere del que presentan los adultos en el juego, así como en otras actividades sociales tales como la exploración y el contacto social (Douglas y cols., 2004).

La existencia de estas diferencias en la modalidad de alojamiento o la edad en que los animales son aislados, plantea la cuestión de si las diferencias en la conducta emocional o agresiva son inducidas por el fármaco o bien moduladas por estas otras variables. El diseño del experimento 8 intenta contestar a esta cuestión. Por ello, nos planteamos evaluar si los efectos del tratamiento con bupropión estaban relacionados con la modalidad de alojamiento de los animales. Con este fin comparamos los ratones que estuvieron aislados desde la adolescencia durante 4 semanas con los que permanecieron siempre agrupados, hipotetizando que los primeros mostrarán más agresividad. Los resultados obtenidos confirman esta hipótesis, lo que nos lleva a la conclusión de que los efectos proagresivos del bupropión resultan evidentes en los ratones con un preexistente déficit social iniciado en la adolescencia (a través del aislamiento de 4 semanas de duración). Similares resultados obtuvieron Hendrie y colaboradores (2003) después de la administración crónica de fluoxetina (ISRS).

Otra comparación de interés se establece entre los animales a los que se les modificó la condición de alojamiento en la adolescencia tardía: nuestros resultados indican diferencias según el momento en que los animales fueron re-agrupados, de modo que los aislados/agrupados mostraron un efecto antiagresivo tras el tratamiento con la dosis alta y media de bupropión, sugiriendo que el tratamiento con bupropión puede tener efectos beneficiosos en los ratones re-socializados en la adolescencia tardía. En cambio, el tratamiento no tuvo efectos cuando los animales estuvieron agrupados y pasaron a un estado socialmente desfavorecido. En estos grupos se observaron unas

medianas mayores en amenaza y ataque que en los grupos que permanecieron agrupados durante todo el experimento.

Los estudios experimentales indican que las modificaciones de las condiciones de alojamiento pueden tener efectos tanto a nivel neurobiológico como comportamental en roedores (Burke y cols., 2015). Okada y colaboradores (2015) observaron diferencias en las interacciones sociales en ratones que se habían mantenido aislados o agrupados durante 2-4 semanas, al ser evaluados en el paradigma de afiliación social. En este estudio se evidenció que las interacciones sociales, incluyendo la conducta agresiva, difería en función de la modalidad de alojamiento: los ratones agrupados mostraron interés por interactuar con el nuevo animal mientras los aislados no mostraron interés por reaccionar con su congénere. Dichos resultados no se ven corroborados en nuestro experimento, ya que las medianas de los grupos que recibieron suero fisiológico fueron similares en los ratones que se mantuvieron siempre agrupados o aislados. Una explicación plausible a estos hallazgos contradictorios podría atribuirse a los diferentes paradigmas utilizados, la especie empleada, los requisitos de la tarea y/o la estimulación ambiental. Si bien, es interesante señalar que el tratamiento con la dosis más alta de bupropión disminuyó el interés por interactuar con su oponente en los aislados, aislados/agrupados y agrupados/aislados sugiriendo que el posible efecto ansiogénico del bupropión se ve atenuado únicamente en el grupo que permaneció siempre agrupado.

Recientemente el grupo de investigación de Burke y Miczek (2015) ha confirmado que durante los encuentros sociales, los ratones machos con frecuencia se dedican a conductas no agresivas como, por ejemplo, andar, olfatear, escarbar o mostrar investigación social. En general, se ha descrito que un aumento en estas conductas se puede observar tras de la administración de fármacos ansiolíticos. Nosotros encontramos que el bupropión (tanto administrado solo o en interacción con nicotina) indujo una disminución significativa en el tiempo dedicado por los animales al autoaseo y a la conducta de escarbar y no tuvo efectos en la conducta de exploración social. En este sentido, nuestros datos no apoyan un posible efecto ansiolítico del bupropión. Por otra parte, otras investigaciones sugieren que se pueden precisar dosis más bajas de ansiolíticos para disminuir la ansiedad y la agresividad cuando los animales están aislados y requerir dosis más altas cuando se encuentra agrupados (Pinna y Ramusson, 2014). En el presente experimento fue la dosis más alta de bupropión la que indujo un

efecto ansiogénico más potente en los ratones agrupados mientras en los aislados fueron las dosis alta e intermedias, confirmando en cierta medida las diferencias señaladas por estos autores.

Consideraciones finales

La revisión teórica realizada en la presente Tesis Doctoral junto con las observaciones experimentales halladas en este trabajo inducen a pensar que el antidepresivo bupropión, ampliamente utilizado también en el tratamiento para la adicción a la nicotina, puede tener un gran potencial farmacológico. A través de los ocho experimentos realizados se ha puesto de manifiesto la complejidad del perfil conductual del fármaco estudiado. Igualmente, los resultados obtenidos son interesantes al confirmar la abundante investigación previa señalando que los adolescentes muestran un perfil diferente a los adultos en las tareas cognitivas, búsqueda de novedad, ansiedad y agresividad. Dicha observación es importante ya que por un lado sugiere que los fármacos evaluados ejercen sus acciones moduladas por la edad en que se administra el fármaco (Smith y cols., 2015) y, por otro, confirma la mayor vulnerabilidad para consumir drogas de abuso en este periodo evolutivo (Walker y cols., 2015) por lo que la investigación en este sentido resulta prioritaria para desarrollar terapias más eficaces.

Los hallazgos recogidos en esta investigación demuestran que el tratamiento con bupropión mejora la capacidad de memoria implícita evaluada en el condicionamiento de evitación activa, pero no tiene efectos o incluso puede deteriorar el aprendizaje espacial de los animales adolescentes al ser valorados en el laberinto de agua. Esta última observación muestra que el bupropión puede influir en la capacidad espacial, dependiendo de la edad de los sujetos, siendo los adolescentes más sensibles a la acción farmacológica del bupropión, lo que pone de manifiesto la importancia de la edad a la hora de valorar los efectos de este fármaco sobre la capacidad de aprendizaje y memoria. Además, el tratamiento con bupropion disminuye el nivel de exploración y la búsqueda de novedad evaluados en el modelo de la tabla de agujeros, siendo más evidente esta reducción cuando se administra conjuntamente con nicotina y, en especial, en la adolescencia. Esta co-administración farmacológica (bupropion + nicotina) también potencia el efecto ansiolítico de la nicotina cuando los animales adolescentes son

expuestos al laberinto elevado en forma de cruz, sugiriendo una acción sinérgica entre ambos fármacos en sus efectos sobre el nivel de ansiedad.

Respecto a los efectos del bupropión sobre la conducta de interacción social un descubrimiento interesante y hasta el momento no descrito en la literatura es el relativo a la influencia de las condiciones de alojamiento en el que se encuentran los animales. Hemos encontrado una acción proagresiva del bupropión en aquellos animales que han sido aislados en la adolescencia, mientras que este fármaco parece tener un efecto anti-agresivo en aquellos animales re-socializados en la adolescencia tardía. Sin embargo, tanto el bupropión como la nicotina, bien administrados solos o conjuntamente, no parecen alterar el nivel de agresión de los animales adultos alojados en grupo. Estas observaciones sugirieron que el nivel basal de agresión previo de los animales modula la acción del bupropión sobre la conducta de interacción social. Además, los datos muestran que la condición de alojamiento y la edad en la que se produce el cambio en la condición de alojamiento tienen efectos en la agresividad, de forma que el aislamiento en la adolescencia tardía parece inducir una elevación en los niveles basales de agresividad.

En suma, los resultados hallados en esta Tesis Doctoral evidencian el interés farmacológico del bupropión, aunque todavía nos encontramos ante un componente del que se desconocen muchas de sus características, tanto a nivel neuroquímico como conductual. A lo largo de este trabajo hemos abordado temas que habían sido escasamente investigados o que todavía no habían sido descritos en la literatura. Los datos aportados ponen de manifiesto la relevancia de indagar en el perfil farmacológico del bupropión. Este estudio deja abiertas nuevas líneas de investigación y plantea, a su vez, la importancia de profundizar en algunas de las variables analizadas. Por ejemplo, identificar la influencia de las diferencias individuales en las acciones de este agente farmacológico, aplicar otros paradigmas conductuales que permitan ampliar el conocimiento del perfil conductual del bupropión, o evaluar la interacción con otras sustancias psicoactivas estimulantes, en particular con la nicotina u otros agonistas nicotínicos con mayor especificidad.

El tratamiento con bupropión es una de las líneas farmacológicas prioritarias para tratar la dependencia nicotínica, bien como alternativa a la terapia de reemplazamiento con nicotina (ejemplo, parches, chicles, sprays nasal) o bien en

combinación con esta sustancia. Aunque a nivel clínico está demostrado que la terapia farmacológica con bupropión reduce los síntomas asociados al síndrome de abstinencia a la nicotina, todavía no existe un conocimiento exacto sobre la acción neuroquímica y conductual de este fármaco, solo o combinado con nicotina o con otras sustancias psicoactivas. Si tenemos en cuenta el problema de salud que representa hoy día el tabaquismo a nivel mundial, profundizar en el conocimiento del bupropión resulta de especial relevancia dado su interés clínico y experimental.

V.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ✓ El bupropión incrementa la conducta de evitación en la tarea de condicionamiento de evitación activa, mostrando los animales tratados con este fármaco un estilo de afrontamiento más activo que el grupo control. Ello evidencia que el bupropión mejora la capacidad de aprendizaje relacionado con la memoria implícita y sugiere que este fármaco facilita el control de las respuestas emocionales.
- ✓ En los ratones adolescentes el bupropión (40 y 20 mg/kg) empeora la adquisición de la tarea en el laberinto de agua, pero no la retención de esa tarea. En cambio, en los ratones adultos este fármaco no produce déficits en su capacidad espacial. Estos resultados evidencian que el bupropión influye sobre el aprendizaje espacial aunque sus efectos dependen de la edad en que se administre el mismo, lo que indicaría una sensibilidad diferencial en los efectos de este fármaco en los ratones adolescentes y adultos.
- ✓ Los efectos inducidos por el bupropión sobre la conducta mostrada por los ratones en la tabla de agujeros indican que la dosis más elevada de este fármaco (40 mg/kg) produce en los ratones adolescentes un descenso en su nivel de exploración y búsqueda de novedad. Sin embargo, el tratamiento con bupropión no induce cambios significativos en los animales adultos. Estas observaciones sugieren que los efectos del bupropión dependen del nivel basal de exploración que presenten los animales, siendo más evidentes cuando estos niveles son elevados como en el caso de los adolescentes.
- ✓ El tratamiento con la dosis más alta de nicotina (1 mg/kg) disminuye la exploración en la tabla de agujeros en los ratones adultos, pero no en los adolescentes. Este hallazgo muestra que la administración de nicotina no altera la conducta de búsqueda de novedad en animales que presentan un alto índice de exploración como ocurre en los ratones adolescentes.

- ✓ La co-administración de bupropión y nicotina causa una disminución de la conducta exploratoria en la tabla de agujeros, tanto en ratones adolescentes como en adultos. Este resultado indica que la interacción farmacológica entre ambos fármacos disminuye el nivel de búsqueda de novedad de los animales.
- ✓ En la tarea del laberinto elevado se observa que los ratones adolescentes presentan un perfil conductual que refleja menor nivel de ansiedad que el mostrado por los animales adultos. El tratamiento agudo con nicotina potencia esta conducta, observándose un efecto ansiolítico en los adolescentes al aumentar el tiempo que permanecieron en brazos abiertos, pero no da lugar a cambios significativos en las conductas realizadas por los adultos en dicho laberinto. Estos resultados sugieren que la edad a la que se administra el fármaco puede ser una variable moduladora en los efectos de la nicotina en modelos animales de ansiedad.
- ✓ El tratamiento con bupropión no induce un claro perfil ansiolítico al no observarse cambios significativos el tiempo pasado en los brazos abiertos o el porcentaje de entradas a los brazos abiertos del laberinto elevado. Sin embargo, cuando este fármaco se administra conjuntamente con nicotina se potencia el efecto ansiolítico de la nicotina, lo que reflejaría una sinergia farmacológica entre ambas sustancias.
- ✓ En la conducta de interacción social el tratamiento con bupropión, nicotina o la co-administración de ambos fármacos no produce cambios significativos en el nivel de agresión que presentan los ratones adultos que han sido alojados en grupo. No obstante, en este paradigma conductual la administración aguda de nicotina refuerza algunos de los efectos observados tras la administración de la dosis más baja de bupropión, tales como la disminución en las conductas de cuidado corporal y escarbar.

- ✓ El tratamiento con bupropión desciende el tiempo que dedican los animales a la exploración social, tanto en los ratones adolescentes (40 mg/kg) como en los adultos (20 y 40 mg/kg). Este descenso también se observa en los grupos tratados con nicotina, aunque solo en los ratones adolescentes. Estos hallazgos muestran que los efectos de la nicotina sobre la interacción social difieren en ratones adolescentes y adultos.

- ✓ Cuando se evalúa la influencia de las condiciones de alojamiento sobre la conducta de interacción social se observa que el tratamiento con la dosis más baja de bupropión (10 mg/kg) induce un aumento de la conducta de amenaza en ratones que permanecen en alojamiento individual durante cuatro semanas. Por el contrario, las dosis altas de bupropión (40 y 20 mg/kg) incrementan las conductas defensivas en los animales que fueron aislados y luego realojados en grupo. Estos resultados sugieren que las condiciones de alojamiento y la edad a la que se administra el bupropión son variables que pueden modular la respuesta a este fármaco, tanto sobre conducta agresiva como sobre otras categorías conductuales.

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Villaca Y, Filgueiras CC, Correa-Santos M, Cavina CC, Naiff VF, Krahe TE, Manhaes AC, Ribeiro-Carvalho A (2015) Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 232:1693-1703. DOI: 10.1007/s00213-014-3801-1 [doi].

Abreu-Villaca Y, Queiroz-Gomes Fdo E, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhaes AC (2006) Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 167:175-182. DOI: S0166-4328(05)00379-7 [pii].

Adriani W, Deroche-Gamonet V, Le Moal M, Laviola G, Piazza PV (2006) Preexposure during or following adolescence differently affects nicotine-rewarding properties in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 184:382-390. DOI: 10.1007/s00213-005-0125-1 [doi].

Adriani W, Laviola G (2004) Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* 15:341-352. DOI: 00008877-200409000-00005 [pii].

Adriani W, Spijker S, Deroche-Gamonet V, Laviola G, Le Moal M, Smit AB, Piazza PV (2003) Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J Neurosci* 23:4712-4716. DOI: 23/11/4712 [pii].

Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G (2002) Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 27:212-224.

Ahsan HM, de la Pena JB, Botanas CJ, Kim HJ, Yu GY, Cheong JH (2014) Conditioned place preference and self-administration induced by nicotine in adolescent and adult rats. *Biomol Ther (Seoul)* 22:460-466. DOI: 10.4062/biomolther.2014.056 [doi].

Andersen A, Due P, Holstein BE, Iversen L (2003) Tracking drinking behaviour from age 15-19 years. *Addiction* 98:1505-1511. DOI: 496 [pii].

Arias HR, Feuerbach D, Bhumireddy P, Ortells MO (2010) Inhibitory mechanisms and binding site location for serotonin selective reuptake inhibitors on nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 42:712-724. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.01.007 [doi].

Armario A, Nadal R (2013) Individual differences and the characterization of animal models of psychopathology: a strong challenge and a good opportunity. *Front Pharmacol* 4:137. DOI: 10.3389/fphar.2013.00137 [doi].

Ascher JA, Cole JO, Colin JN, Feighner JP, Ferris RM, Fibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E (1995) Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. *J Clin Psychiatry* 56:395-401.

Avital A, Ram E, Maayan R, Weizman A, Richter-Levin G (2006) Effects of early-life stress on behavior and neurosteroid levels in the rat hypothalamus and entorhinal cortex. *Brain Res Bull* 68:419-424. DOI: S0361-9230(05)00416-8 [pii].

Aydin C, Oztan O, Isgor C (2012) Nicotine-induced anxiety-like behavior in a rat model of the novelty-seeking phenotype is associated with long-lasting neuropeptidergic and neuroplastic adaptations in the amygdala: effects of the cannabinoid receptor 1 antagonist AM251. *Neuropharmacology* 63:1335-1345. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.08.016 [doi].

Baarendse PJ, Counotte DS, O'Donnell P, Vanderschuren LJ (2013) Early social experience is critical for the development of cognitive control and dopamine modulation of prefrontal cortex function. *Neuropsychopharmacology* 38:1485-1494. DOI: 10.1038/npp.2013.47 [doi].

Bailey SR, Crew EE, Riske EC, Ammerman S, Robinson TN, Killen JD (2012) Efficacy and tolerability of pharmacotherapies to aid smoking cessation in adolescents. *Paediatr Drugs* 14:91-108. DOI: 10.2165/11594370-000000000-00000 [doi].

Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Tang XC, Toda S, Kalivas PW (2003) Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat Neurosci* 6:743-749. DOI: 10.1038/nn1069 [doi].

Bali A, Jaggi AS (2015) Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur J Pharmacol* 746:282-292. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.10.017 [doi].

Bali A, Jaggi AS (2013) Angiotensin as stress mediator: role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacol Res* 76:49-57. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.07.004 [doi].

Bang SJ, Commons KG (2011) Age-dependent effects of initial exposure to nicotine on serotonin neurons. *Neuroscience* 179:1-8. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.01.032 [doi].

Bardo MT, Cain ME, Bylica KE (2006) Effect of amphetamine on response inhibition in rats showing high or low response to novelty. *Pharmacol Biochem Behav* 85:98-104. DOI: S0091-3057(06)00225-5 [pii].

Barros DM, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I (2002) Bupropion and sertraline enhance retrieval of recent and remote long-term memory in rats. *Behav Pharmacol* 13:215-220.

Baune BT, Renger L (2014) Pharmacological and non-pharmacological interventions to improve cognitive dysfunction and functional ability in clinical depression--a systematic review. *Psychiatry Res* 219:25-50. DOI: 10.1016/j.psychres.2014.05.013 [doi].

Benowitz NL (2009) Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:57-71. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742 [doi].

Bert B, Fink H, Huston JP, Voits M (2002) Fischer 344 and wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance. *Neurobiol Learn Mem* 78:11-22. DOI: 10.1006/nlme.2001.4040 [doi].

Beuzen A, Belzung C (1995) Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis. *Physiol Behav* 58:111-118. DOI: 0031938495000139 [pii].

Bevins RA, Wilkinson JL, Palmatier MI, Siebert HL, Wiltgen SM (2006) Characterization of nicotine's ability to serve as a negative feature in a Pavlovian appetitive conditioning task in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 184:470-481. DOI: 10.1007/s00213-005-0079-3 [doi].

Biala G, Kruk M (2009) Influence of bupropion and calcium channel antagonists on the nicotine-induced memory-related response of mice in the elevated plus maze. *Pharmacol Rep* 61:236-244.

Biala G, Kruk M, Budzyska B (2009) Effects of the cannabinoid receptor ligands on anxiety-related effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. *J Physiol Pharmacol* 60:113-122.

Billes SK, Cowley MA (2008) Catecholamine reuptake inhibition causes weight loss by increasing locomotor activity and thermogenesis. *Neuropsychopharmacology* 33:1287-1297. DOI: 1301526 [pii].

Blair RJ (2004) The roles of orbital frontal cortex in the modulation of antisocial behavior. *Brain Cogn* 55:198-208. DOI: 10.1016/S0278-2626(03)00276-8 [doi].

Blanco-Gandía, María C.; Mateos-García, Ana; García-Pardo, María P.; Montagud-Romero, Sandra; Rodríguez-Arias, Marta; Miñarro, José; Aguilar, María A. Effect of drugs of abuse on social behaviour: a review of animal models. *Behavioural Pharmacology: September 2015 - Volume 26 - Issue 6 - Special Issue Pharmacological Approaches to the Study of Social Behaviour - Part 1: Reviews - p 541–570*

Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC (2003) Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav* 44:161-170. DOI: S0018506X03001272 [pii].

Boissier JR, Simon P, Lwoff JM (1964) Use of a Particular Mouse Reaction (Hole Board Method) for the Study of Psychotropic Drugs. *Therapie* 19:571-583.

Bolanos CA, Glatt SJ, Jackson D (1998). Subsensitvity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. *Dev. Brain. Res.* 111, 25-33.

Boyer, T. (2006). The development of risk-taking: A multi-perspective review. *Developmental Review*, 26, 291-345.

Brain PF, Poole AE (1974) Proceedings: Further investigations on the effects of adrenalectomy and pituitary-adrenocortical hormone treatments on isolation-induced fighting behaviour in male albino mice. *J Endocrinol* 61:xliv=xliv.

Brain PF, Evans CM (1975) attempts to influence fighting and threat behaviors in adult isolated female CFW mice in standard opponent aggression test using injected and subcutaneously implanted androgens. *Physiology and behavior* 14(5): 551-556.

Brain PF, Benton D, Childs G, Parmigiani S (1981) The effect of the type of opponent in tests of murine aggression. *Behav Processes* 6:319-327. DOI: 10.1016/0376-6357(81)90049-8 [doi].

Brain PF, McAllister KH, Walmsley SV. 1989. Drug effects on social behaviour: Methods in ethopharmacology. In: Boulten AA, Baker GB, Greenshaw AJ (eds). *Neuromethods. Psychopharmacology*. Vol. 13. Clifton, NJ: The Human Press Inc, pp 687–739.

Brain PF, Kusumorini N, Benton D (1991) ‘Anxiety’ in laboratory rodents: a brief review of some recent behavioural developments. *Behav Processes* 25:71–80.

Bruijnzeel AW, Markou A (2003) Characterization of the effects of bupropion on the reinforcing properties of nicotine and food in rats. *Synapse* 50:20-28. DOI: 10.1002/syn.10242 [doi].

- Budzynska B, Boguszewska-Czubara A, Kruk-Slomka M, Kurzepa J, Biala G (2015) Mephedrone and nicotine: oxidative stress and behavioral interactions in animal models. *Neurochem Res* 40:1083-1093. DOI: 10.1007/s11064-015-1566-5 [doi].
- Burke AR, Miczek KA (2015) Escalation of cocaine self-administration in adulthood after social defeat of adolescent rats: role of social experience and adaptive coping behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 232:3067-3079. DOI: 10.1007/s00213-015-3947-5 [doi].
- Burke AR, Miczek KA (2014) Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)* 231:1557-1580
- Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM (2011) Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1713-1721. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.004 [doi].
- Bystritsky A, Kerwin L, Feusner JD, Vapnik T (2008) A pilot controlled trial of bupropion XL versus escitalopram in generalized anxiety disorder. *Psychopharmacol Bull* 41:46-51.
- Cahill K, Stevens S, Perera R, Lancaster T (2013) Pharmacological interventions for smoking cessation: an overview and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 5:CD009329. DOI: 10.1002/14651858.CD009329.pub2 [doi].
- Calatayud F, Belzung C, Aubert A (2004) Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. *Behav Processes* 67:195-206. DOI: 10.1016/j.beproc.2004.04.002 [doi].
- Carmack SA, Howell KK, Rasaei K, Reas ET, Anagnostaras SG (2014) Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. *Learn Mem* 21:82-89. DOI: 10.1101/lm.033613.113 [doi].
- Carrasco C, Vicens P, Redolat R (2006) Neuroprotective effects of behavioural training and nicotine on age-related deficits in spatial learning. *Behav Pharmacol* 17:441-452. DOI: 00008877-200609000-00010 [pii].
- Carrasco MC, Vidal J, Redolat R (2013) Bupropion induced changes in exploratory and anxiety-like behaviour in NMRI male mice depends on the age. *Behav Processes* 98:117-124. DOI: 10.1016/j.beproc.2013.05.002 [doi].
- Carrasco MC, Vicens P, Vidal J, Redolat R (2006) Effects of co-administration of bupropion and nicotinic agonists on the elevated plus-maze test in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:455-462. DOI: S0278-5846(05)00367-2 [pii].
- Carrasco MC, Vicens P, Vidal J, Redolat R (2004) Effects of acute administration of bupropion on behavior in the elevated plus-maze test by NMRI mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:1135-1141. DOI: S0278-5846(04)00128-9 [pii].
- Carrillo M, Ricci LA, Coppersmith GA, Melloni RH, Jr (2009) The effect of increased serotonergic neurotransmission on aggression: a critical meta-analytical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 205:349-368. DOI: 10.1007/s00213-009-1543-2 [doi].
- Casarrubea M, Davies C, Faulisi F, Pierucci M, Colangeli R, Partridge L, Chambers S, Cassar D, Valentino M, Muscat R, Benigno A, Crescimanno G, Di Giovanni G (2015) Acute nicotine induces anxiety and disrupts temporal pattern organization of rat exploratory behavior in hole-

- board: a potential role for the lateral habenula. *Front Cell Neurosci* 9:197. DOI: 10.3389/fncel.2015.00197 [doi].
- Castells X, Casas M, Perez-Mana C, Roncero C, Vidal X, Capella D (2010) Efficacy of psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD007380. doi:CD007380. DOI: 10.1002/14651858.CD007380.pub3 [doi].
- Chase HW, Hogarth L (2011) Impulsivity and symptoms of nicotine dependence in a young adult population. *Nicotine Tob Res* 13:1321-1325. DOI: 10.1093/ntr/ntr114 [doi].
- Cheeta S, Kenny PJ, File SE (2000) Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24:1053-1067. DOI: S0278-5846(00)00129-9 [pii].
- Cinciripini PM, Robinson JD, Karam-Hage M, Minnix JA, Lam C, Versace F, Brown VL, Engelmann JM, Wetter DW (2013) Effects of varenicline and bupropion sustained-release use plus intensive smoking cessation counseling on prolonged abstinence from smoking and on depression, negative affect, and other symptoms of nicotine withdrawal. *JAMA Psychiatry* 70:522-533. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2013.678 [doi].
- Clapper JR, Athanacio J, Wittmer C, Griffin PS, D'Souza L, Parkes DG, Roth JD (2013) Effects of amylin and bupropion/naltrexone on food intake and body weight are interactive in rodent models. *Eur J Pharmacol* 698:292-298. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.010 [doi].
- Collins SL, Izenwasser S (2004) Chronic nicotine differentially alters cocaine-induced locomotor activity in adolescent vs. adult male and female rats. *Neuropharmacology* 46:349-362.
- Comissaris RL, Ellis DM, Hill TJ, Schefke DM, Becker CA, Fontana DJ (1990) Chronic antidepressant and clonidine treatment effects on conflict behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37: 167-176
- Cooper BR, Hester TJ, Maxwell RA (1980) Behavioral and biochemical effects of the antidepressant bupropion (Wellbutrin): evidence for selective blockade of dopamine uptake in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 215:127-134.
- Cooper TB, Suckow RF, Glassman A (1984) Determination of bupropion and its major basic metabolites in plasma by liquid chromatography with dual-wavelength ultraviolet detection. *J Pharm Sci* 73:1104-1107.
- Costa C, Araujo A, Brasil M, Cruz M (2015) Possible addiction transference from cocaine insufflation to oral bupropion in bipolar patient. *J Addict Med* 9:155-156. DOI: 10.1097/ADM.0000000000000098 [doi].
- Counotte DS, Spijker S, Van de Burgwal LH, Hogenboom F, Schoffemeer AN, De Vries TJ, Smit AB, Pattij T (2009) Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats. *Neuropsychopharmacology* 34:299-306. DOI: 10.1038/npp.2008.96 [doi].
- Craig EL, Zhao B, Cui JZ, Novalen M, Miksys S, Tyndale RF (2014) Nicotine pharmacokinetics in rats is altered as a function of age, impacting the interpretation of animal model data. *Drug Metab Dispos* 42:1447-1455. DOI: 10.1124/dmd.114.058719 [doi].
- Cruz FC, Delucia R, Planeta CS (2005) Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 80:411-417. DOI: S0091-3057(04)00402-2 [pii].

- Cunha MP, Machado DG, Capra JC, Jacinto J, Bettio LE, Rodrigues AL (2012) Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. *J Psychopharmacol* 26:1489-1501. DOI: 10.1177/0269881112447989 [doi].
- Cunha MP, Machado DG, Bettio LE, Capra JC, Rodrigues AL (2008) Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1913-1920. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2008.09.006 [doi].
- Cutler MG (1993) Comparison of the effects of yohimbine and clonidine on the behaviour of female mice during social encounters in an ‘‘approach-avoidance’’ situation. *Neuropharmacology* 32:411–417.
- Cutler MG (1994) Anxiolytic drugs: does ethopharmacological analysis indicate commonalties in their mode of action? In: Cooper SJ, Hendrie CA, eds. *Ethol Psychopharmacol*, pp. 45–58..
- D’Amato FR, Cabib S (1987) Chronic exposure to a novel odor increases pups’ vocalizations, maternal care, and alters dopaminergic functioning in developing mice. *Behav Neural Biol* 48:197–205.
- Damaj MI, Grabus SD, Navarro HA, Vann RE, Warner JA, King LS, Wiley JL, Blough BE, Lukas RJ, Carroll FI (2010) Effects of hydroxymetabolites of bupropion on nicotine dependence behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 334:1087-1095. DOI: 10.1124/jpet.110.166850 [doi].
- Damaj MI, Martin BR (1993) Is the dopaminergic system involved in the central effects of nicotine in mice? *Psychopharmacology (Berl)* 111:106-108.
- Darmani NA, Shaddy J, Gerdes CF (1996) Differential ontogenesis of three DOI-induced behaviors in mice. *Physiol Behav* 60:1495-1500. DOI: S0031-9384(96)00323-X [pii].
- Daviss WB, Perel JM, Birmaher B, Rudolph GR, Melhem I, Axelson DA, Brent DA (2006) Steady-state clinical pharmacokinetics of bupropion extended-release in youths. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:1503-1509. DOI: 10.1097/01.chi.0000237704.05143.bd [doi].
- Daviss WB, Perel JM, Rudolph GR, Axelson DA, Gilchrist R, Nuss S, Birmaher B, Brent DA (2005) Steady-state pharmacokinetics of bupropion SR in juvenile patients. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 44:349-357. DOI: S0890-8567(09)61486-6 [pii].
- Denenberg VH, Kim DS, Palmiter RD (2004) The role of dopamine in learning, memory, and performance of a water escape task. *Behav Brain Res* 148:73-78. DOI: S0166432803001839 [pii].
- De Boer SF, Koolhaas JM (2003) Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* 463: 145-161.
- D’Hooge R, Nagels G, Franck F, Bakker CE, Reyniers E, Storm K, Kooy RF, Oostra BA, Willems PJ, De Deyn PP (1997) Mildly impaired water maze performance in male *Fmr1* knockout mice. *Neuroscience* 76:367-376. DOI: S0306-4522(96)00224-2 [pii].
- Dong J, Blier P (2001) Modification of norepinephrine and serotonin, but not dopamine, neuron firing by sustained bupropion treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 155:52-57.
- Doremus TL, Brunell SC, Rajendran P, Spear LP (2005) Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1796-1808. DOI: 00000374-200510000-00005 [pii].

- Doremus TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2004) Age-related differences in elevated plus maze behavior between adolescent and adult rats. *Ann N Y Acad Sci* 1021:427-430. DOI: 10.1196/annals.1308.057 [doi].
- Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP (2003) Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75:411-418. DOI: S0091305703001345 [pii].
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (2004) Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Dev Psychobiol* 45:153-162. DOI: 10.1002/dev.20025 [doi].
- Duclot F, Kabbaj M (2013) Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *J Neurosci* 33:11048-11060. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0199-13.2013 [doi].
- Dwoskin LP, Rauhut AS, King-Pospisil KA, Bardo MT (2006) Review of the pharmacology and clinical profile of bupropion, an antidepressant and tobacco use cessation agent. *CNS Drug Rev* 12:178-207. DOI: CNS178 [pii].
- Ebbert JO, Hatsukami DK, Croghan IT, Schroeder DR, Allen SS, Hays JT, Hurt RD (2014) Combination varenicline and bupropion SR for tobacco-dependence treatment in cigarette smokers: a randomized trial. *JAMA* 311:155-163. DOI: 10.1001/jama.2013.283185 [doi].
- Einon D, Morgan MJ. 1978. Habituation under different levels of stimulation in socially reared and isolated rats: A test of the arousal hypothesis. *Behav Biol* 22:553-558.
- El Mansari M, Ghanbari R, Janssen S, Blier P (2008) Sustained administration of bupropion alters the neuronal activity of serotonin, norepinephrine but not dopamine neurons in the rat brain. *Neuropharmacology* 55:1191-1198. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.028 [doi].
- Emmanuel NP, Lydiard RB, Ballenger JC (1991) Treatment of social phobia with bupropion. *J Clin Psychopharmacol* 11:276-277.
- Esmoris-Arranz FJ, Mendez C, Spear NE (2008) Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. *Behav Processes* 78:340-350. DOI: 10.1016/j.beproc.2008.01.010 [doi].
- Espert R, Navarro JF, Salvador A, Simon VM (1993) Effects of morphine hydrochloride on social encounters between male mice. *Aggress Behav* 19: 377-383.
- Estelles J, Rodriguez-Arias M, Aguilar MA, Minarro J (2004) Social behavioural profile of cocaine in isolated and grouped male mice. *Drug Alcohol Depend* 76:115-123. DOI: S0376871604001322 [pii].
- Falco AM, McDonald CG, Bachus SE, Smith RF (2014) Developmental alterations in locomotor and anxiety-like behavior as a function of D1 and D2 mRNA expression. *Behav Brain Res* 260:25-33. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.11.007 [doi].
- Farley AC, Hajek P, Lycett D, Aveyard P (2012) Interventions for preventing weight gain after smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD006219. DOI: 10.1002/14651858.CD006219.pub3 [doi].

Ferrari PF, Parmigiani S, Rodgers RJ, Palanza P (1997) Differential effects of chlordiazepoxide on aggressive behavior in male mice: the influence of social factors. *Psychopharmacology (Berl)* 134:258-265.

File SE, Wardill AG (1975) The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia* 44: 47-51

File SE, Seth P (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 463:35–53

Gallagher M, Burwell R, Burchinal M (1993) Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 107:618-626.

Galvan A (2010) Adolescent development of the reward system. *Front Hum Neurosci* 4:6. DOI: 10.3389/neuro.09.006.2010 [doi].

Garske AK, Lawyer CR, Peterson BM, Illig KR (2013) Adolescent changes in dopamine D1 receptor expression in orbitofrontal cortex and piriform cortex accompany an associative learning deficit. *PLoS One* 8:e56191. DOI: 10.1371/journal.pone.0056191 [doi].

Glick SD, Maisonneuve IM, Kitchen BA (2002) Modulation of nicotine self-administration in rats by combination therapy with agents blocking alpha 3 beta 4 nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol* 448:185-191. DOI: S0014299902019441 [pii].

Goldberg JF, Freeman MP, Balon R, Citrome L, Thase ME, Kane JM, Fava M (2015) The American Society of Clinical Psychopharmacology Survey of Psychopharmacologists' Practice Patterns for the Treatment of Mood Disorders. *Depress Anxiety* 32:605-613. DOI: 10.1002/da.22378 [doi].

Goniewicz ML, Delijewski M (2013) Nicotine vaccines to treat tobacco dependence. *Hum Vaccin Immunother* 9:13-25. DOI: 10.4161/hv.22060 [doi].

Goodwin AK, Lantz-McPeak SM, Robinson BL, Law CD, Ali SF, Ferguson SA (2015) Effects of adolescent treatment with nicotine, harmaline, or norharmaline in male Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol Teratol* 47:25-35. DOI: 10.1016/j.ntt.2014.10.005 [doi].

Grabus SD, Carroll FI, Damaj MI (2012) Bupropion and its main metabolite reverse nicotine chronic tolerance in the mouse. *Nicotine Tob Res* 14:1356-1361. DOI: 10.1093/ntr/nts088 [doi].

Grady SR, Moretti M, Zoli M, Marks MJ, Zanardi A, Pucci L, Clementi F, Gotti C (2009) Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the alpha3beta4* and alpha3beta3beta4* subtypes mediate acetylcholine release. *J Neurosci* 29:2272-2282. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5121-08.2009 [doi].

Grégoire S, Michaud V, Chapuy E, Eschalier A, Ardid D (2012) Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: effect of duloxetine and gabapentin. *Pain* 153:1657-1663

Gualtieri CT, Johnson LG (2007) Bupropion normalizes cognitive performance in patients with depression. *MedGenMed* 9:22. DOI: 550429 [pii].

Gunther L, Liebscher S, Jahkel M, Oehler J (2008) Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT1A and 5-HT2A receptors in group- and isolation-housed mice. *Eur J Pharmacol* 593:49-61. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.07.011 [doi].

Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron MG, Bonisch H (2009) Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 111:403-416. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06345.x [doi].

Hajhashemi V, Khanjani P (2014) Analgesic and anti-inflammatory activities of bupropion in animal models. *Res Pharm Sci* 9:251-257.

Hall BJ, Slade S, Wells C, Rose JE, Levin ED (2015) Bupropion-varenicline interactions and nicotine self-administration behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 130:84-89. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.01.009 [doi].

Hamedi M, Mohammadi M, Ghaleiha A, Keshavarzi Z, Jafarnia M, Keramatfar R, Alikhani R, Ehyaii A, Akhondzadeh S (2014) Bupropion in adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a randomized, double-blind study. *Acta Med Iran* 52:675-680.

Han DH, Renshaw PF (2012) Bupropion in the treatment of problematic online game play in patients with major depressive disorder. *J Psychopharmacol* 26:689-696. DOI: 10.1177/0269881111400647 [doi].

Hariri AR, Holmes A (2006) Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends Cogn Sci* 10:182-191. DOI: S1364-6613(06)00056-8 [pii].

Hayashi E, Kuratani K, Kinoshita M, Hara H (2010) Pharmacologically distinctive behaviors other than burying marbles during the marble burying test in mice. *Pharmacology* 86:293-296. DOI: 10.1159/000321190 [doi].

Hays JT, Ebbert JO (2003) Bupropion sustained release for treatment of tobacco dependence. *Mayo Clin Proc* 78:1020-4; quiz 1024. DOI: S0025-6196(11)63149-2 [pii].

Heal DJ, Gosden J, Smith SL (2012) What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs? *Neuropharmacology* 63:132-146. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.01.017 [doi].

Hefner K, Holmes A (2007) Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 176:210-215. DOI: S0166-4328(06)00529-8 [pii].

Hendrie CA, Pickles AR, Duxon MS, Riley G, Hagan JJ, (2003). Effects of fluoxetine on social behaviour and plasma corticosteroid levels in female Mongolian gerbils.

Behav. Pharmacol. 14, 545–550.

Hernández-Lozano M, Ana G. Gutiérrez-García AG, Contreras CM, Gabriela Alcántara-López MG (2010) Efectos del bupropión sobre depresión, ansiedad y abstinencia a nicotina. *Arch Neurocién (Mex)* Vol. 15, No. 4: 260-266.

Hertzberg MA, Moore SD, Feldman ME, Beckham JC (2001) A preliminary study of bupropion sustained-release for smoking cessation in patients with chronic posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychopharmacol* 21:94-98.

Hewett K, Gee MD, Krishen A, Wunderlich HP, Le Clus A, Evoniuk G, Modell JG (2010) Double-blind, placebo-controlled comparison of the antidepressant efficacy and tolerability of bupropion XR and venlafaxine XR. *J Psychopharmacol* 24:1209-1216. DOI: 10.1177/0269881109106953 [doi].

- Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* 3:167-181.
- Holder MK, Blaustein JD (2014) Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. *Front Neuroendocrinol* 35:89-110. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.10.004 [doi].
- Hong AS, Elrashidi MY, Schroeder DR, Ebbert JO (2015) Depressive symptoms among patients receiving varenicline and bupropion for smoking cessation. *J Subst Abuse Treat* 52:78-81. DOI: 10.1016/j.jsat.2014.11.010 [doi].
- Hughes JR, Stead LF, Hartmann-Boyce J, Cahill K, Lancaster T (2014) Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD000031. DOI: 10.1002/14651858.CD000031.pub4 [doi].
- Hughes JR, Stead LF, Lancaster T (2007) Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD000031. DOI: 10.1002/14651858.CD000031.pub3 [doi].
- Hutchison C, Weiss JM (2005) A selective test for antidepressant treatments using rats bred for stress-induced reduction of motor activity in the swim test *Psychopharmacology* 182 (1) 9-23
- Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ (2004) Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14:636-648. DOI: 10.1002/hipo.10207 [doi].
- Jackson KJ, Martin BR, Changeux JP, Damaj MI (2008) Differential role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in physical and affective nicotine withdrawal signs. *J Pharmacol Exp Ther* 325:302-312. DOI: 10.1124/jpet.107.132977 [doi].
- Jiao X, Beck KD, Stewart AL, Smith IM, Myers CE, Servatius RJ, Pang KC (2014) Effects of psychotropic agents on extinction of lever-press avoidance in a rat model of anxiety vulnerability. *Front Behav Neurosci* 8:322. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00322 [doi].
- Johnson SK, Carlson KM, Lee J, Burr LE, Wagner GC (2003) Effects of nicotine on target biting and resident-intruder attack. *Life Sci* 73:311-317. DOI: S0024320503002893 [pii].
- Jorenby DE, Leischow SJ, Nides MA, Rennard SI, Johnston JA, Hughes AR, Smith SS, Muramoto ML, Daughton DM, Doan K, Fiore MC, Baker TB (1999) A controlled trial of sustained-release bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. *N Engl J Med* 340:685-691. DOI: 10.1056/NEJM199903043400903 [doi].
- Joshi D, Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2005) Reversal of triazolam tolerance and withdrawal-induced hyperlocomotor activity and anxiety by bupropion in mice. *Pharmacology* 75:93-97. DOI: 87189 [pii].
- Kagan BL, Sultzer DL, Rosenlicht N, Gerner RH (1990) Oral S-adenosylmethionine in depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 147:591-595.
- Kale PP, Addepalli V (2015) Enhancement of nootropic effect of duloxetine and bupropion by caffeine in mice. *Indian J Pharmacol* 47:199-201. DOI: 10.4103/0253-7613.153430 [doi].

Kale PP, Addepalli V, Sarkar A, Patel S, Savai J (2014) The Combination of Antidepressant Duloxetine with Piracetam in Mice does not Produce Enhancement of Nootropic Activity. *Exp Neurobiol* 23:224-230. DOI: 10.5607/en.2014.23.3.224 [doi].

Kalueff AV, Tuohimaa P. 2004. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:151–158.

Kavoussi RJ, Segraves RT, Hughes AR, Ascher JA, Johnston JA (1997) Double-blind comparison of bupropion sustained release and sertraline in depressed outpatients. *J Clin Psychiatry* 58:532-537.

Kimchi R (2009) Perceptual organization and visual attention. *Prog Brain Res* 176:15-33. DOI: 10.1016/S0079-6123(09)17602-1 [doi].

Kitamura Y, Yagi T, Kitagawa K, Shinomiya K, Kawasaki H, Asanuma M, Gomita Y (2010) Effects of bupropion on the forced swim test and release of dopamine in the nucleus accumbens in ACTH-treated rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382:151-158. DOI: 10.1007/s00210-010-0521-x [doi].

Kliethermes CL, Crabbe JC (2006) Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85:57-65. DOI: S0091-3057(06)00217-6 [pii].

Klimek V, Nowak G, Czyrak A (1985) Central effects of repeated treatment with bupropion. *Pol J Pharmacol Pharm* 37:243-252.

Knackstedt LA, LaRowe S, Mardikian P, Malcolm R, Upadhyaya H, Hedden S, Markou A, Kalivas PW (2009) The role of cystine-glutamate exchange in nicotine dependence in rats and humans. *Biol Psychiatry* 65:841-845. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.10.040 [doi].

Knight C, Howard P, Baker CL, Marton JP (2010) The cost-effectiveness of an extended course (12+12 weeks) of varenicline compared with other available smoking cessation strategies in the United States: an extension and update to the BENESCO model. *Value Health* 13:209-214. DOI: 10.1111/j.1524-4733.2009.00672.x [doi].

Kollins SH, English J, Robinson R, Hallyburton M, Chrisman AK (2009) Reinforcing and subjective effects of methylphenidate in adults with and without attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Psychopharmacology (Berl)* 204:73-83. DOI: 10.1007/s00213-008-1439-6 [doi].

Konrad K, Firk C, Uhlhaas PJ (2013) Brain development during adolescence: neuroscientific insights into this developmental period. *Dtsch Arztebl Int* 110:425-431. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0425 [doi].

Kosten TR, Kosten TA (2004) New medication strategies for comorbid substance use and bipolar affective disorders. *Biol Psychiatry* 56:771-777. DOI: S0006-3223(04)00817-0 [pii].

Kota D, Martin BR, Robinson SE, Damaj MI (2007) Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *J Pharmacol Exp Ther* 322:399-407. DOI: jpet.107.121616 [pii].

Kruk M, Tendera K, Biala G (2011) Memory-related effects of cholinergic receptor ligands in mice as measured by the elevated plus maze test. *Pharmacol Rep* 63:1372-1382.

- Kruk-Slomka M, Michalak A, Budzynska B, Biala G (2014) A comparison of mecamylamine and bupropion effects on memory-related responses induced by nicotine and scopolamine in the novel object recognition test in mice. *Pharmacol Rep* 66:638-646. DOI: 10.1016/j.pharep.2014.02.002 [doi].
- Kupferschmidt DA, Funk D, Erb S, Le AD (2010) Age-related effects of acute nicotine on behavioural and neuronal measures of anxiety. *Behav Brain Res* 213:288-292. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.05.022 [doi].
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27:19-31. DOI: S014976340300006X [pii].
- Le Houezec J, Aubin HJ (2013) Pharmacotherapies and harm-reduction options for the treatment of tobacco dependence. *Expert Opin Pharmacother* 14:1959-1967. DOI: 10.1517/14656566.2013.818978 [doi].
- Lee SS, Humphreys KL, Flory K, Liu R, Glass K (2011) Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 31:328-341. DOI: 10.1016/j.cpr.2011.01.006 [doi].
- Levin ED, Lawrence SS, Petro A, Horton K, Rezvani AH, Seidler FJ, Slotkin TA (2007) Adolescent vs. adult-onset nicotine self-administration in male rats: duration of effect and differential nicotinic receptor correlates. *Neurotoxicol Teratol* 29:458-465. DOI: S0892-0362(07)00026-8 [pii].
- Levin ED, Rezvani AH, Montoya D, Rose JE, Swartzwelder HS (2003) Adolescent-onset nicotine self-administration modeled in female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 169:141-149. DOI: 10.1007/s00213-003-1486-y [doi].
- Levis AS, Mineur YS, Smith PH, Cahuzac E L, Picciotto MR (2015) Modulation of aggressive behavior in mice by nicotinic receptor subtypes *Biochem.Pharmacol* 97, 4, 488-497, Elsevier Inc, England
- Liebenauer LL, Slotnick BM (1996) Social organization and aggression in a group of olfactory bulbectomized male mice. *Physiol Behav* 60:403-409. DOI: S0031-9384(96)80011-4 [pii].
- Lipina T, Roder J (2010) A new model of the disrupted latent inhibition in C57BL/6J mice after bupropion treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 208:487-498. DOI: 10.1007/s00213-009-1749-3 [doi].
- Liu X, Caggiula AR, Palmatier MI, Donny EC, Sved AF (2008) Cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats: effect of bupropion, persistence over repeated tests, and its dependence on training dose. *Psychopharmacology (Berl)* 196:365-375. DOI: 10.1007/s00213-007-0967-9 [doi].
- Litvin Y, Pentkowski NS, Pobbe RL, Blanchard C, Blanchard R (2008) Unconditioned models of fear and anxiety. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 17: 81-99
- Logue SF, Gould TJ (2014) The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacol Biochem Behav* 123:45-54. DOI: 10.1016/j.pbb.2013.08.007 [doi].

- Lukkes JL, Watt MJ, Lowry CA, Forster GL (2009) Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Front Behav Neurosci* 3:18. DOI: 10.3389/neuro.08.018.2009 [doi].
- Lynn, DA, Brown GR (2010) The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Dev. Psychobiol.* 52: 731–739.
- Majidi-Zolbanin J, Azarfarin M, Samadi H, Enayati M, Salari AA (2013) Adolescent fluoxetine treatment decreases the effects of neonatal immune activation on anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 250:123-132. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.05.003 [doi].
- Malin DH, Lake JR, Smith TD, Khambati HN, Meyers-Paal RL, Montellano AL, Jennings RE, Erwin DS, Presley SE, Perales BA (2006) Bupropion attenuates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 184:494-503. DOI: 10.1007/s00213-005-0135-z [doi].
- Maneeton N, Maneeton B, Eurviriyankul K, Srisurapanont M (2013) Efficacy, tolerability, and acceptability of bupropion for major depressive disorder: a meta-analysis of randomized-controlled trials comparison with venlafaxine. *Drug Des Devel Ther* 7:1053-1062. DOI: 10.2147/DDDT.S46849 [doi].
- Marco EA, Llorente R, Pérez-Álvarez L, Moreno E, Guaza C, Viveros MP (2005) The μ -opioid receptor is involved in the stimulating effect of nicotine on adrenocortical activity but not in nicotine induced anxiety *Behavioural Brain Research* 163: 212–218
- Markou A, Paterson NE (2009) Multiple motivational forces contribute to nicotine dependence. *Nebr Symp Motiv* 55:65-89.
- Masuda Y, Ishigooka S, Matsuda Y (2000) Digging behavior of ddY mouse. *Exp Anim* 49: 235-237.
- Matsumoto K, Ono K, Ouchi H, Tsushima R, Murakami Y (2012) Social isolation stress down-regulates cortical early growth response 1 (Egr-1) expression in mice. *Neurosci Res* 73:257-262. DOI: 10.1016/j.neures.2012.04.004 [doi].
- Matsumoto K, Puia G, Dong E, Pinna G (2007) GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders. *Stress* 10:3-12. DOI: 773420807 [pii].
- McCann DJ, Li SH (2012) A novel, nonbinary evaluation of success and failure reveals bupropion efficacy versus methamphetamine dependence: reanalysis of a multisite trial. *CNS Neurosci Ther* 18:414-418. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2011.00263.x [doi].
- Miczek KA, Fish EW, De Bold JF, De Almeida RM (2002) Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology (Berl)* 163:434-458. DOI: 10.1007/s00213-002-1139-6 [doi].
- Modol L, Darbra S, Pallares M (2011) Neurosteroids infusion into the CA1 hippocampal region on exploration, anxiety-like behaviour and aversive learning. *Behav Brain Res* 222:223-229. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.058 [doi].

- Mohammadi M, Akhondzadeh S (2011) Advances and considerations in attention-deficit/hyperactivity disorder pharmacotherapy. *Acta Med Iran* 49:487-498. DOI: 19341 [pii].
- Moragrega I, Carmen Carrasco M, Redolat R (2005) Effects of housing and nicotine on shuttle-box avoidance in male NMRI mice. *Behav Brain Res* 164:178-187. DOI: S0166-4328(05)00265-2 [pii].
- Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P, Redolat R (2003) Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration. *Behav Brain Res* 147:1-8. DOI: S0166432803001128 [pii].
- Mori T, Shibasaki M, Ogawa Y, Hokazono M, Wang TC, Rahmadi M, Suzuki T (2013) Comparison of the behavioral effects of bupropion and psychostimulants. *Eur J Pharmacol* 718:370-375. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.07.046 [doi].
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60. DOI: 0165-0270(84)90007-4 [pii].
- Muhammad A, Mychasiuk R, Hosain S, Nakahashi A, Carroll C, Gibb R, Kolb B (2013) Training on motor and visual spatial learning tasks in early adulthood produces large changes in dendritic organization of prefrontal cortex and nucleus accumbens in rats given nicotine prenatally. *Neuroscience* 12;252:178-89. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.016. Epub 2013 Aug 19.
- Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H (1997) Effects of dopaminergic agents on reversal of reserpine-induced impairment in conditioned avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58:829-836. DOI: S0091-3057(97)98984-X [pii].
- Nasehi M, Mafi F, Oryan S, Nasri S, Zarrindast MR (2011) The effects of dopaminergic drugs in the dorsal hippocampus of mice in the nicotine-induced anxiogenic-like response. *Pharmacol Biochem Behav* 98:468-473. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.02.011 [doi].
- Navarrete F, Rodriguez-Arias M, Martin-Garcia E, Navarro D, Garcia-Gutierrez MS, Aguilar MA, Aracil-Fernandez A, Berbel P, Minarro J, Maldonado R, Manzanares J (2013) Role of CB2 cannabinoid receptors in the rewarding, reinforcing, and physical effects of nicotine. *Neuropsychopharmacology* 38:2515-2524. DOI: 10.1038/npp.2013.157 [doi].
- Navarro JF, Rivera A, Maldonado E, Cavas M, de la Calle A (2004) Anxiogenic-like activity of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ("Ecstasy") in the social interaction test is accompanied by an increase of c-fos expression in mice amygdala. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:249-254. DOI: S0278584603002513 [pii].
- Navarro JF, Postigo D, Martin M, Buron E (2006) Antiaggressive effects of MPEP, a selective antagonist of mGlu5 receptors, in agonistic interactions between male mice. *Eur J Pharmacol* 551:67-70.
- Navarro JF, Maldonado E (2002) Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:1151-1154. DOI: S0278-5846(02)00250-6 [pii].
- Nelson RJ, Trainor BC (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8:536-546. DOI: nrn2174 [pii].

Neumeister KL, Riepe MW (2012) Bupropion and Citalopram in the APP23 Mouse Model of Alzheimer's Disease: A Study in a Dry-Land Maze. *Int J Alzheimers Dis* 2012:673584. DOI: 10.1155/2012/673584 [doi].

Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1992) Effects of chronic bupropion on interstitial concentrations of dopamine in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology* 7:7-14.

Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1989) Acute effects of bupropion on extracellular dopamine concentrations in rat striatum and nucleus accumbens studied by in vivo microdialysis. *Neuropsychopharmacology* 2:273-279.

Okada R, Fujiwara H, Mizuki d, Araki R, Yabe T, Matsumoto K (2015) Involvement of dopaminergic and cholinergic systems in social isolation-induced deficits in social affiliation and conditional fear memory. *Neuroscience* 299 134–145

Ortmann R (1985) The conditioned place preference paradigm in rats: effect of bupropion. *Life Sci* 37:2021-2027.

Pandhare A, Hamouda AK, Staggs B, Aggarwal S, Duddempudi PK, Lever JR, Lapinsky DJ, Jansen M, Cohen JB, Blanton MP (2012) Bupropion binds to two sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain: a photoaffinity labeling study with the bupropion analogue [(125)I]-SADU-3-72. *Biochemistry* 51:2425-2435. DOI: 10.1021/bi300101r [doi].

Paterson NE (2009) Behavioural and pharmacological mechanisms of bupropion's anti-smoking effects: recent preclinical and clinical insights. *Eur J Pharmacol* 603:1-11. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.12.009 [doi].

Paterson NE, Balfour DJ, Markou A (2008) Chronic bupropion differentially alters the reinforcing, reward-enhancing and conditioned motivational properties of nicotine in rats. *Nicotine Tob Res* 10:995-1008. DOI: 10.1080/14622200802097571 [doi].

Paterson NE, Balfour DJ, Markou A (2007) Chronic bupropion attenuated the anhedonic component of nicotine withdrawal in rats via inhibition of dopamine reuptake in the nucleus accumbens shell. *Eur J Neurosci* 25:3099-3108. DOI: EJN5546 [pii].

Pedraza C, Davila G, Martin-Lopez M, Navarro JF (2007) Antiaggressive effects of GHB in OF1 strain mice: Involvement of dopamine D(2) receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:337–342

Pellow S (1985) Can drug effects on anxiety and convulsions be separated? *Neurosci Biobehav Rev* 9:55-73.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167. DOI: 0165-0270(85)90031-7 [pii].

Penetar DM, Looby AR, Ryan ET, Maywalt MA, Lukas SE (2012) Bupropion reduces some of the symptoms of marijuana withdrawal in chronic marijuana users: a pilot study. *Subst Abuse* 6:63-71. DOI: 10.4137/SART.S9706 [doi].

Pérez de los Cobos (2006) Tratado SET de trastornos adictivos. Sociedad Española de Toxicomanías -571 páginas. Editorial médica Panamericana

Pesola GR, Avasarala J (2002) Bupropion seizure proportion among new-onset generalized seizures and drug related seizures presenting to an emergency department. *J Emerg Med* 22:235-239. DOI: S0736467901004747 [pii].

Philpot RM, Wecker L (2008) Dependence of adolescent novelty-seeking behavior on response phenotype and effects of apparatus scaling. *Behav Neurosci* 122:861-875. DOI: 10.1037/0735-7044.122.4.861 [doi].

Pinna G, Rasmusson AM (2014) Ganaxolone improves behavioral deficits in a mouse model of post-traumatic stress disorder *Front.Cell.Neurosci.* 8, 256, Switzerland

Piri M, Nasehi M, Shahab Z, Zarrindast MR (2012) The effects of nicotine on nitric oxide induced anxiogenic-like behaviors in the dorsal hippocampus. *Neurosci Lett* 528:93-98. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.08.074 [doi].

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.

Portugal GS, Gould TJ (2007) Bupropion dose-dependently reverses nicotine withdrawal deficits in contextual fear conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 88:179-187. DOI: S0091-3057(07)00258-4 [pii].

Poshivalov VP, Sudoplatov EN (1986) New television setup for automatic recording of intraspecific contacts of laboratory rodents. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 36:582-584.

Prior H, Schwegler H, Ducker G (1997) Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behav Brain Res* 87:183-194. DOI: S0166-4328(97)02282-1 [pii].

Radhakrishnan R, Santamaria A, Escobar L, Arias HR (2013) The beta4 nicotinic receptor subunit modulates the chronic antidepressant effect mediated by bupropion. *Neurosci Lett* 555:68-72. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.08.009 [doi].

Ramasubbu R (2002) Treatment of resistant depression by adding noradrenergic agents to lithium augmentation of SSRIs. *Ann Pharmacother* 36:634-640.

Rauhut AS, Hawrylak M, Mardekian SK (2008) Bupropion differentially alters the aversive, locomotor and rewarding properties of nicotine in CD-1 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 90:598-607. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.05.002 [doi].

Rauhut AS, Dwoskin LP, Bardo MT (2005) Tolerance does not develop to the decrease in nicotine self-administration produced by repeated bupropion administration. *Nicotine Tob Res* 7:901-907. DOI: M0782435M80QN4H7 [pii].

Rauhut AS, Neugebauer N, Dwoskin LP, Bardo MT (2003) Effect of bupropion on nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 169:1-9. DOI: 10.1007/s00213-003-1450-x [doi].

Redolat R, Perez-Martinez A, Carrasco MC, Mesa P (2009) Individual differences in novelty-seeking and behavioral responses to nicotine: a review of animal studies. *Curr Drug Abuse Rev* 2:230-242.

Redolat R, Gomez MC, Vicens P, Carrasco MC (2005) Bupropion effects on aggressiveness and anxiety in OF1 male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 177:418-427. DOI: 10.1007/s00213-004-1965-9 [doi].

Redolat R, Vidal J, Gómez MC, Carrasco MC (2005) Effects of acute bupropion administration on locomotor activity in adolescent and adult mice. *Behav Pharmacol.* 16(1):59-62.

Redolat R, Oterino MC, Carrasco MC, Berry MS, Brain PF (2000) Effects of acute administration of nicotine and lobeline on agonistic encounters in male mice. *Aggressive behavior volumen* 26:376-385.

Redolat R, Brain PF, Simon VM (1991) sulphiride has an antiaggressive effect in mice without markedly depressing motor activity *Neuropharmacology* 30(1) 41-46.

Redolat R, Oterino MC, Carrasco MC, Brain PF (2002) A specific anti-aggressive effect of repeatedly administered lobeline. *Addict Biol* 7:301-306. DOI: 10.1080/13556210220139514 [doi].

Rezaee OSM, Akbarpour F (2012) A placebo-controlled trial of bupropion for improving the positive and negative symptoms of schizophrenia. *Int. J. Collaborative Res. Int. Med. Public Health* 4: 1223-1230.

Robertson B, Wang L, Diaz MT, Aiello M, Gersing K, Beyer J, Mukundan S,Jr, McCarthy G, Doraiswamy PM (2007) Effect of bupropion extended release on negative emotion processing in major depressive disorder: a pilot functional magnetic resonance imaging study. *J Clin Psychiatry* 68:261-267.

Rodriguez-Arias M, Felip CM, Broseta I, Minarro J (1999) The dopamine D3 antagonist U-99194A maleate increases social behaviors of isolation-induced aggressive male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 144:90-94.

Rodgers RJ, Cole JC (1994) The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Chichester, Wiley, pp. 9–44.

Rosell DR, Siever LJ (2015) The neurobiology of aggression and violence. *CNS Spectr* 20:254-279. DOI: 10.1017/S109285291500019X [doi].

Rothman RB, Glowa JR (1995) A review of the effects of dopaminergic agents on humans, animals, and drug-seeking behavior, and its implications for medication development. Focus on GBR 12909. *Mol Neurobiol* 11:1-19. DOI: 10.1007/BF02740680 [doi].

Rolinski Z, Herbut M (1981) The importance of central nicotinic receptors in footshock-induced aggression in mice. *Pol J Pharmacol Pharm* 33:569–576.

Saitoh A, Hirose N, Yamada M, Yamada M, Nozaki C, Oka T, Kamei J (2006) Changes in emotional behavior of mice in the hole-board test after olfactory bulbectomy. *J Pharmacol Sci* 102:377-386. DOI: JST.JSTAGE/jphs/FP0060837 [pii].

Saiz Ruiz J, Gibert J, Gutierrez Fraile M, Bobes J, Vallejo J, Iglesias C, Iriarte V (2011) Bupropion: efficacy and safety in the treatment of depression. *Actas Esp Psiquiatr* 39 Suppl 1:1-25.

Salas R, Sturm R, Boulter J, De Biasi M (2009) Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J Neurosci* 29:3014-3018. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4934-08.2009 [doi].

Santamaria A, Arias HR (2010) Neurochemical and behavioral effects elicited by bupropion and diethylpropion in rats. *Behav Brain Res* 211:132-139. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.03.023 [doi].

Schoevers RA, Van HL, Koppelmans V, Kool S, Dekker JJ (2008) Managing the patient with comorbid depression and an anxiety disorder. *Drugs* 68:1621-1634. DOI: 68122 [pii].

Schwartz JJ, Melloni RH, Jr (2010) Dopamine activity in the lateral anterior hypothalamus modulates AAS-induced aggression through D2 but not D5 receptors. *Behav Neurosci* 124:645-655. DOI: 10.1037/a0020899 [doi].

Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1998) D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J Neurosci* 18:1613-1621.

Schochet TL, Kelley AE, Landry CF (2004) Differential behavioral effects of nicotine exposure in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 175:265-273.

Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H (2010) Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 87:521-536. DOI: 10.1016/j.lfs.2010.09.004 [doi].

Shoib M, Sidhpura N, Shafait S (2003) Investigating the actions of bupropion on dependence-related effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 165:405-412. DOI: 10.1007/s00213-002-1277-x [doi].

Shram MJ, Funk D, Li Z, Le AD (2008) Nicotine self-administration, extinction responding and reinstatement in adolescent and adult male rats: evidence against a biological vulnerability to nicotine addiction during adolescence. *Neuropsychopharmacology* 33:739-748. DOI: 1301454 [pii].

Shytle RD, Silver AA, Wilkinson BJ, Sanberg PR (2002) A pilot controlled trial of transdermal nicotine in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *World J Biol Psychiatry* 3:150-155.

Sidhpura N, Redfern P, Rowley H, Heal D, Wonnacott S (2007) Comparison of the effects of bupropion and nicotine on locomotor activation and dopamine release in vivo. *Biochem Pharmacol* 74:1292-1298. DOI: S0006-2952(07)00386-3 [pii].

Siever LJ (2008) Neurobiología de la agresividad y la violencia. *Am J Psychiatry (Ed Esp)*; 11:399-411

Simmler LD, Wandeler R, Liechti ME (2013) Bupropion, methylphenidate, and 3,4-methylenedioxypyrovalerone antagonize methamphetamine-induced efflux of dopamine according to their potencies as dopamine uptake inhibitors: implications for the treatment of methamphetamine dependence. *BMC Res Notes* 6:220-0500-6-220. DOI: 10.1186/1756-0500-6-220 [doi].

Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI (2000) Bupropion is a nicotinic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 295:321-327.

Sluyter F, Korte SM, Bohus B, Van Oortmerssen GA (1996) Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 113-6.

Smith RF, McDonald CG, Bergstrom HC, Ehlinger DG, Brielmaier JM (2015) Adolescent nicotine induces persisting changes in development of neural connectivity. *Neurosci Biobehav Rev* 55:432-443. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.019 [doi].

Somerville LH, Casey BJ (2010) Developmental neurobiology of cognitive control and motivational systems. *Curr Opin Neurobiol* 20:236-241. DOI: 10.1016/j.conb.2010.01.006 [doi].

Spear L (2000) Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health* 24:115-123.

Spear LP (2004) Adolescent brain development and animal models. *Ann N Y Acad Sci* 1021:23-26. DOI: 10.1196/annals.1308.002 [doi].

Spear LP (2007) Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol Teratol* 29:1-9. DOI: S0892-0362(06)00161-9 [pii].

Spear LP (2014) Adolescents and alcohol: acute sensitivities, enhanced intake, and later consequences. *Neurotoxicol Teratol* 41:51-59. DOI: 10.1016/j.ntt.2013.11.006 [doi].

Stahl S (2013) *Psicofarmacologia esencial*, Madrid: Aula Médica

Stansfield KH, Philpot RM, Kirstein CL (2004) An animal model of sensation seeking: the adolescent rat. *Ann N Y Acad Sci* 1021:453-458. DOI: 10.1196/annals.1308.063 [doi].

Stanton A, Grimshaw G (2013) Tobacco cessation interventions for young people. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD003289. DOI: 10.1002/14651858.CD003289.pub5 [doi].

Stead LF, Koilpillai P, Lancaster T (2015) Additional behavioural support as an adjunct to pharmacotherapy for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 10:CD009670. DOI: 10.1002/14651858.CD009670.pub3 [doi].

Stead LF, Hartmann-Boyce J, Perera R, Lancaster T (2013) Telephone counselling for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD002850. DOI: 10.1002/14651858.CD002850.pub3 [doi].

Stead LF, Lancaster T (2012) Combined pharmacotherapy and behavioural interventions for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 10:CD008286. DOI: 10.1002/14651858.CD008286.pub2 [doi].

Steinberg L. (2007). Risk-taking in adolescence: New perspectives from brain and behavioral science. *Current Directions in Psychological Science*, 16, 55-59.

Suckow RF, Smith TM, Perumal AS, Cooper TB (1986) Pharmacokinetics of bupropion and metabolites in plasma and brain of rats, mice, and guinea pigs. *Drug Metab Dispos* 14:692-697.

Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T (1998) Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350:21-29. DOI: S0014-2999(98)00223-4 [pii].

- Takeda T, Tsuji M, Ikoshi H, Yamada T, Masuya J, Iimori M, Matsumiya T (2005) Effects of a 5-HT(7) receptor antagonist DR4004 on the exploratory behavior in a novel environment and on brain monoamine dynamics in mice. *Eur. J.Pharmacol.* 518, 30–39.
- Taraschenko OD, Panchal V, Maisonneuve IM, Glick SD (2005) Is antagonism of alpha3beta4 nicotinic receptors a strategy to reduce morphine dependence? *Eur J Pharmacol* 513:207-218. DOI: S0014-2999(05)00250-5 [pii].
- Thakkar KB, Jain MM, Billa G, Joshi A, Khobragade AA (2013) A drug utilization study of psychotropic drugs prescribed in the psychiatry outpatient department of a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res* 7:2759-2764. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6760.3885 [doi].
- Thanos P, Delis F, Rosko L, Volkow ND (2013) Passive Response to Stress in Adolescent Female and Adult Male Mice after Intermittent Nicotine Exposure in Adolescence. *J Addict Res Ther Suppl* 6:007. DOI: 10.4172/2155-6105.S6-007 [doi].
- Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, Amin N... (2010) Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet* 42:448-453. DOI:
- Thierry AM, Gioanni Y, Degénetais E, et al. (2000) Hippocampus prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* (10):411-9.
- Tonstad S, Aubin HJ (2012) Efficacy of a dose range of surinabant, a cannabinoid receptor blocker, for smoking cessation: a randomized controlled clinical trial. *J Psychopharmacol* 26:1003-1009. DOI: 10.1177/02698811111431623 [doi].
- Tonstad S, Tonnesen P, Hajek P, Williams KE, Billing CB, Reeves KR, Varenicline Phase 3 Study Group (2006) Effect of maintenance therapy with varenicline on smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 296:64-71. DOI: 296/1/64 [pii].
- Trigo JM, Zimmer A, Maldonado R (2009) Nicotine anxiogenic and rewarding effects are decreased in mice lacking beta-endorphin. *Neuropharmacology* 56:1147-1153. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.03.013 [doi].
- Tsoory M, Cohen H, Richter-Levin G (2007) Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:245-256. DOI: S0924-977X(06)00124-6 [pii].
- Tutka P, Mroz T, Klucha K, Piekarczyk M, Wielosz M (2005) Bupropion-induced convulsions: preclinical evaluation of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 64:13-22. DOI: S0920-1211(05)00019-7 [pii].
- Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM, Breese CR (2004) An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav Brain Res* 150:159-170. DOI: 10.1016/j.bbr.2003.07.005 [doi].
- Valdman AV, Poshivalov VP (1986) Pharmacological analysis of antidepressant drug effects. *Pharmacol Biochem Behav* 25:515-519. DOI: 0091-3057(86)90133-4 [pii].
- Van Boven JF, Vemer P (2015) Higher Adherence During Reimbursement of Pharmacological Smoking Cessation Treatments. *Nicotine Tob Res*. DOI: ntv064 [pii].

Van Goethem NP, Rutten K, Van der Staay FJ, Jans LA, Akkerman S, Steinbusch HW, Blokland A, van't Klooster J, Prickaerts J (2012) Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behav Brain Res* 232:323-334. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.03.023 [doi].

Van Ree JM, Niesink RJ. 1983. Low doses of beta-endorphin increase social contacts of rats tested in dyadic encounters. *Life Sci* 33:611-614.

Vanderschuren LJ, Trezza V (2014) What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. *Curr Top Behav Neurosci* 16:189-212. DOI: 10.1007/7854_2013_268 [doi].

Varani AP, Balerio GN (2012) GABA(B) receptors involvement in the effects induced by nicotine on anxiety-related behaviour in mice. *Pharmacol Res* 65:507-513. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.03.001 [doi].

Varlinskaya EI, Spear LP, Spear NE (1999) social behavior and social motivation in adolescents rats: Role of housing conditions and partner's activity. *Physiology and behavior* 67: 475-482.

Vázquez-Gómez E, Arias HR, Feuerbach D, Miranda-Morales M, Mihailescu S, Targowska-Duda KM, Jozwiak K, García-Colunga J (2014) Bupropion-induced inhibition of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors expressed in heterologous cells and neurons from dorsal raphe nucleus and hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 5;740:103-11. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.059. Epub 2014 Jul 9.

Vento AE, Schifano F, Gentili F, Pompei F, Corkery JM, Kotzalidis GD, Girardi P (2013) Bupropion perceived as a stimulant by two patients with a previous history of cocaine misuse. *Ann Ist Super Sanita* 49:402-405. DOI: DOI: 10.4415/ANN_13_04_14 [doi].

Vicens P, Carrasco MC, Redolat R (2003) Effects of early training and nicotine treatment on the performance of male NMRI mice in the water maze. *Neural Plast* 10:303-317. DOI: 10.1155/NP.2003.303 [doi].

Vinader-Caerols C, Brain PF, Parra A, Simon VM (1992) An ethological analysis of the effects of diazepam and nitrazepam on the responses of female mice to anosmic males encountered in a novel arena. *Behav Pharmacol* 3:427-433.

Wadden TA, Foreyt JP, Foster GD, Hill JO, Klein S, O'Neil PM, Perri MG, Pi-Sunyer FX, Rock CL, Erickson JS, Maier HN, Kim DD, Dunayevich E (2011) Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: the COR-BMOD trial. *Obesity (Silver Spring)* 19:110-120. DOI: 10.1038/oby.2010.147 [doi].

Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322-328. DOI: nprot.2007.44 [pii].

Walker, Q.D., Schramm-Sapyta, N.L., Caster, J.M., Waller, S.T., Brooks, M.P., Kuhn, C.M (2009) Novelty-induced locomotion is positively associated with cocaine ingestion in adolescent rats; anxiety is correlated in adults. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91, 398-408.

Ward MM, Swan GE, Jack LM (2001) Self-reported abstinence effects in the first month after smoking cessation. *Addict Behav* 26:311-327. DOI: S0306-4603(00)00107-6 [pii].

Weaver MT, Geier CF, Levin ME, Caggiula AR, Sved AF, Donny EC (2012) Adolescent exposure to nicotine results in reinforcement enhancement but does not affect adult responding in rats. *Drug Alcohol Depend* 125:307-312. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2012.03.006 [doi].

West CH, Weiss JM (2005) A selective test for antidepressant treatments using rats bred for stress-induced reduction of motor activity in the swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 182:9-23. DOI: 10.1007/s00213-005-0048-x [doi].

Whitaker LR, Degoulet M, Morikawa H (2013) Social deprivation enhances VTA synaptic plasticity and drug-induced contextual learning. *Neuron* 77:335-345. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.11.022 [doi].

Wilens TE, Spencer TJ, Biederman J, Girard K, Doyle R, Prince J, Polisner D, Solhkhah R, Comeau S, Monuteaux MC, Parekh A (2001) A controlled clinical trial of bupropion for attention deficit hyperactivity disorder in adults. *Am J Psychiatry* 158:282-288.

Wiley JL, Lavecchia KL, Martin BR, Damaj MI (2002) Nicotine-like discriminative stimulus effects of bupropion in rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 10:129-135.

Wilkes S (2008) The use of bupropion SR in cigarette smoking cessation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3:45-53.

Wilkes S (2006) Bupropion. *Drugs Today (Barc)* 42:671-681. DOI: 1025701 [pii].

Wilkinson JL, Carroll FI, Bevins RA (2010) An investigation of bupropion substitution for the interoceptive stimulus effects of nicotine. *J Psychopharmacol* 24:817-828. DOI: 10.1177/0269881109102518 [doi].

Wilkinson JL, Li C, Bevins RA (2009) Pavlovian drug discrimination with bupropion as a feature positive occasion setter: substitution by methamphetamine and nicotine, but not cocaine. *Addict Biol* 14:165-173. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2008.00141.x [doi].

Wilkinson JL, Bevins RA (2007) Bupropion hydrochloride produces conditioned hyperactivity in rats. *Physiol Behav* 90:790-796. DOI: S0031-9384(07)00008-X [pii].

Xiongjun Q, Jijun S, Hongchang Y, Yi H, Xiaofeng P and Ren-ai X (2014) Evaluation of CYP2C9 activity in rats: Use of tolbutamide alone and in combined with bupropion. *Iran. J. Pharm. Res.* 13: 635-639.

Yamada J, Sugimoto Y, Yamada S (2004) Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 504:207-211. DOI: S0014-2999(04)01148-3 [pii].

Yassini M, Shariat N, Nadi M, Amini F, Vafae M (2014) The effects of bupropion on negative symptoms in schizophrenia. *Iran J Pharm Res* 13:1227-1233.

Yoon G, Westermeyer J (2013) Intranasal bupropion abuse: case report. *Am J Addict* 22:180-0391.2013.00329.x. DOI: 10.1111/j.1521-0391.2013.00329.x [doi].

Young R, Glennon RA (2002) Nicotine and bupropion share a similar discriminative stimulus effect. *Eur J Pharmacol.* 443(1-3):113-8.

Young KD, Erickson K, Nugent AC, Fromm SJ, Mallinger AG, Furey ML, Drevets WC (2012) Functional anatomy of autobiographical memory recall deficits in depression. *Psychol Med.* 42(2):345-57. doi: 10.1017/S0033291711001371. Epub 2011 Jul 29.

Young KA, Liu Y, Gobrogge KL, Wang H, Wang Z (2014) Oxytocin Reverses Amphetamine-Induced Deficits in Social Bonding: Evidence for an Interaction with Nucleus Accumbens Dopamine. *The Journal of Neuroscience* 34(25): 8499–8506

Zarrindast MR, Tajik R, Ebrahimi-Ghiri M, Nasehi M, Rezayof A (2013) Role of the medial septum cholinceptors in anxiogenic-like effects of nicotine. *Physiol Behav* 119:103-109. DOI: 10.1016/j.physbeh.2013.06.004 [doi].

Zarrindast MR, Aghamohammadi-Sereshki A, Rezayof A, Rostami P (2012) Nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus-maze: possible role of NMDA receptors of the central amygdala. *J Psychopharmacol* 26:555-563. DOI: 10.1177/0269881111412094 [doi].

Zarrindast MR, Taheri S, Rezayof A (2010) The effects of histaminergic agents in the nucleus accumbens of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Iran J Psychiatry* 5:11-17.