

UNIVERSITAT
JAUME•I

NUCLEUS INCERTUS **Y ADICCIÓN**

TRABAJO DE FIN DE GRADO DE MEDICINA

Autor: Jose Antonio Nova Marqués
Tutor: Francisco Eliseo Olucha Bordonau
Departamento: Unidad Predepartamental de Medicina

Trabajo de Fin de Grado
Grado en Medicina
Curso 2016/17

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	2
Extended Summary	3
Lista de abreviaturas	4
Introducción	5
La adicción como enfermedad neuropsiquiátrica	5
Neurofisiología del nucleus incertus, la relaxina-3 y su receptor, RXFP3.....	7
Distribución neuroanatómica de fibras positivas para RLN3 y RXFP3; inputs y outputs del nucleus incertus.....	10
Modelos animales para el estudio de conductas adictivas.....	11
Líneas de investigación del sistema RLN3/RXFP3	12
Material y métodos	13
Resultados	16
Vías de recompensa y adicción	16
Implicación del <i>nucleus incertus</i> en los procesos de consciencia (<i>arousal</i>) y estrés.....	20
Ritmo theta y <i>nucleus incertus</i>	25
La conducta alimentaria como modelo comparativo a la enfermedad adictiva	27
Alcohol y <i>nucleus incertus</i> en el estudio de las conductas adictivas	30
Discusión	32
Conclusión	35
Perspectivas futuras	36
Referencias	36

Resumen

La enfermedad adictiva, un problema sociosanitario presente en la sociedad contemporánea, es una patología cuyo sustrato neurobiológico aún no está claramente dilucidado. El *nucleus incertus* y su sistema de señalización RLN3/RXFP3 juega un papel clave en la modulación del estrés, hecho fuertemente asociado con la expresión de receptores para CRF. La distribución de RLN3/RXFP3 en circuitos límbicos clave sugiere que puede modular la excitación, el estado de ánimo y la recompensa. Se ha observado que la administración de un antagonista para RLN3 disminuye tanto la autoadministración de alcohol como la inducción de estrés secundaria a la falta de alcohol. Se ha destacado el neurocircuito involucrado en la adicción a drogas y en la ingesta de alimentos apetecibles que conduce a la obesidad y, valorando que existen semejanzas entre la enfermedad adictiva y otras patologías con componente psiquiátrico como los trastornos alimentarios, se ha observado también la mediación de la RLN3 en el incremento de la ingesta mediado por estrés. Por todo ello, cada día parece estar más claro que el estudio del papel modulador del *nucleus incertus* en los procesos cognitivos es necesario para comprender en su totalidad la neurobiología de la enfermedad adictiva.

Palabras clave: nucleus incertus, relaxina-3, adicción, arousal, alcohol, ritmo theta.

Abstract

Addictive disease, a socio-sanitary problem present in contemporary society, is a pathology whose neurobiological substrate is not clearly elucidated yet. Nucleus incertus and its RLN3/RXFP3 signaling system play a key role in stress modulation, which is strongly associated with the expression of receptors for CRF. The distribution of RLN3/RXFP3 in key limbic circuits suggests that it can modulate arousal, mood and reward. Administration of an antagonist for RLN3 has been shown to decrease both self-administration of alcohol and induction of stress secondary to lack of alcohol. It has been emphasized the neurocircuit involved in drug addiction and the intake of appetizing foods that leads to obesity and, valuing that there are similarities between addictive disease and other pathologies with a psychiatric component such as eating disorders, has also been observed mediation Of RLN3 in the increase of the stress-mediated intake. Therefore, every day it seems clear that the study of the modulating role of nucleus incertus in cognitive processes is necessary to fully understand the neurobiology of addictive disease.

Keywords: nucleus incertus, relaxin-3, addiction, arousal, alcohol, theta rhythm.

Extended Summary

The aim of the present review is to analyze and top ut in common the different discoveries that demonstrate the involvement of nucleus incertus and its RLN3/RXFP3 signaling system in the multiple neurobiological processes that generate the pathophysiological substrate of addiction.

Great advances have been made in the knowledge of the neurobiological processes that underlie addiction. However, there are crucial aspects of the addictive process that remain unresolved, such as craving, as well as the neurobiological and psychopathological mechanisms that underlie frequent relapses in toxic habits. In relation to this, multiple studies are being carried out that target the NI, expanding the available information about the functions that it can perform. The innervation pattern of NI, the wide variety of neuropeptides and receptors it expresses, together with the findings that RLN3 can modulate food intake, responses to stress, excitation and interactions with CRF systems lead to the That such a system can modulate behavioral aspects related to substance use and abuse. There are multiple studies that relate processes such as stress and dietary intake with NI, there are multiple pathologies (bulimia, purgative anorexia) that show an unequivocal relationship between stress and compulsive and unstructured dietary intake. There are studies that demonstrate the mediation of RLN3 in the increase of the intake mediated by stress. Other pathologies, such as obesity, may also be related to addictive behaviors.

The methodology proposed for this review begins by suggesting the absence of an updated review of the NI / RLN3 / RXFP3 system in relation to addiction. Different sources of information were consulted, mainly a search of scientific articles was made through the PubMed search system. Of the total of articles found, an initial reading of the most current revisions of the subject was made first and from this the most recent articles were ordered. The information was organized using the Mendeley tool. After a first reading, it is observed that in the existing review literature there is no review about the NI / RLN3 / RXFP3 system around the neurobiology of addiction. After a second, more specific reading, an analysis was made on the main articles with the most important ideas and the most relevant

aspects for the subject of study, by reading the summaries and conclusions of those articles. A critical analysis of the articles of greatest interest and on which the work is carried out was then performed.

The main conclusions of this review are that the NI / RLN3 / RXFP3 system plays a key role in stress modulation, which is strongly related to its receptor expression for CRF, and modulates the processes that have been revealed to be affected by stress situations . Addiction occurs as a disease that originates from natural reward pathways but in which it alters regional neurobiology, degenerating into a series of processes that perpetuate addiction. The integration of CNS functions into the addiction model, such as the circadian rhythm, theta rhythm, or motor behavior, results in the collection of new information. Therefore, it is necessary to continue betting on the integration of the study of problems as addiction with the basic knowledge of the neurobiology of the CNS, so that the physiological state can be compared with the pathological situations. On the other hand, the use of agonists and antagonists, increasingly selective, for multiple targets in the CNS are the premise for new treatments.

Lista de abreviaturas

5-HT, serotonina; AA, autoadministración; AEIC, autoestimulación eléctrica intracraneal; ATV, área tegmental ventral; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CAL, condicionamiento de aversión de lugar; CCA, corteza cingulada anterior; COF, corteza orbitofrontal; CPL, condicionamiento de preferencia de lugar; CRF, factor liberador de corticotropina; CRF₁, receptor tipo 1 para el factor liberador de corticotropina; DA, dopamina; DR, (núcleo) dorsal del rafe; Hb, habénula; HbL, habénula lateral; HbM, habénula medial; KO, *knockout*; NA, núcleo accumbens; NI, *nucleus incertus*; NSO, núcleo supraóptico; OEDT, observatorio español de la droga y las toxicomanías; PAG, sustancia gris periacueductal; CPF, corteza prefrontal; PVN, núcleo paraventricular; RLN3, relaxina-3; RPO, (núcleo) reticular ponto oral; RXFP3, receptor de péptido 3 de familia de relaxina; SNC, sistema nervioso central; TE, troncoencéfalo; TRM, (núcleo) tegmental rostromedial.

Introducción

La adicción como enfermedad neuropsiquiátrica

La enfermedad adictiva se puede definir como una patología del sistema nervioso central (SNC) debida a una disfunción neurobiológica de estructuras cerebrales mesencefálicas, límbicas y corticales, y de circuitos cerebrales implicados en la motivación y la conducta. Puede tener su inicio en cualquier etapa de la vida y debutar con cualquier sustancia, con juego patológico (1), dependencia emocional (2), o incluso una adicción al trabajo. Posteriormente se pueden ir añadiendo otras conductas adictivas químicas o comportamentales con un agravamiento progresivo de la enfermedad y un ensombrecimiento de su pronóstico (3). El trastorno que se genera invade progresivamente todas las esferas de la vida del individuo (familia, sociedad, relaciones sociales, trabajo...), generando un grave problema social y de salud física y mental.

La adicción es un problema que hoy en día se extiende a múltiples ámbitos y adopta múltiples formas que en determinadas condiciones afectan muy negativamente a la conducta derivando todos los recursos vitales a la consecución de los motivos de la adicción. La adicción se presenta en múltiples formas: al juego, al sexo, al ejercicio físico, a la tecnología, así como la dilación o la dependencia emocional. Sin embargo, una de las adicciones que más impacto causa a la sociedad actual es la dependencia a sustancias psicoactivas o adicción a drogas. Según el Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías (OEDT), en 2014 se registraron en España 48.926 admisiones a tratamiento por abuso o dependencia de sustancias psicoactivas (excluyendo alcohol y tabaco) (4). En 2001 un 4% de la población española de 15-64 había consumido éxtasis o drogas de diseño alguna vez en su vida, un 3% anfetaminas o speed y un 2,8% alucinógenos (5). Es evidente que la adicción es un problema sociosanitario en todo el mundo. Desde el punto de vista biomédico resulta necesario conocer las bases biológicas del proceso adictivo para poder desarrollar tratamientos eficaces.

Los trastornos relacionados con sustancias de abuso engloban 10 grupos diferentes de drogas: (i) el alcohol, (ii) la cafeína, (iii) el cannabis, (iv) los alucinógenos (fenciclidina, dietilamida de ácido lisérgico y otros alucinógenos), (v) los inhalantes, (vi) los opiáceos,

(vii) los sedantes, hipnóticos y ansiolíticos, (viii) los estimulantes (anfetamina, cocaína y otros estimulantes), (ix) el tabaco, y (x) otras sustancias (o sustancias desconocidas) (6). Cuando estas drogas se consumen en exceso producen una activación directa del sistema de recompensa cerebral, implicado en el refuerzo comportamental y en la producción de recuerdos. El sustrato anatómico principal de este sistema es la vía mesolímbica que se origina en el área tegmental ventral (ATV) y se proyecta hacia el núcleo accumbens (NA) y diferentes áreas corticales que incluyen la corteza cingulada anterior (CCA), la corteza orbitofrontal (COF) y la corteza prefrontal (CPF) (7).

Es interesante señalar que en el trastorno por consumo de sustancias se producen unos cambios en los circuitos cerebrales que persisten tras la desintoxicación. Los efectos comportamentales de estos cambios cerebrales se muestran en las recaídas repetidas y en el deseo intenso de consumo (*craving*) cuando la persona se expone a estímulos relacionados con la droga. Cuanto más intensos hayan sido los efectos reforzantes de una determinada sustancia, más persistentes van a ser también los recuerdos relacionados con ella y más profundo el *craving*, que puede dispararse en determinadas situaciones y que también puede poner en marcha comportamientos automáticos de búsqueda y consumo de dicha sustancia. La dependencia cursa también con un deterioro de la capacidad de autocontrol sobre el consumo de la sustancia. Los individuos con menores niveles de autocontrol reflejan disfunciones en los mecanismos de inhibición cerebral, entre los que está fuertemente implicada la CPF, y están, en consecuencia, más predispuestos a desarrollar trastornos por consumo de sustancias. Asimismo, es importante destacar que al activar el circuito de recompensa cerebral, las sustancias psicoactivas utilizan los mismos mecanismos fisiológicos que los reforzantes naturales (agua, comida, conducta sexual).

Desde el punto de vista psicológico y psiquiátrico, las adicciones asocian o incluyen una serie de trastornos como ansiedad, depresión, pensamientos obsesivos, aislamiento, trastornos afectivos, trastornos en las relaciones sociales, problemas escolares como el fracaso escolar, dificultades ocupacionales o interpersonales, aislamiento y negligencia en las responsabilidades sociales o personales, e inquietud mental o física (8). En los casos en que el individuo reduce o detiene un comportamiento adictivo específico se produce una fatiga excesiva, cambios en el estilo de vida, reducción significativa de la actividad

física, privación y cambios en los patrones de sueño, impaciencia, violencia, trastornos alimentarios y síntomas de abstinencia.

Según el OEDT, el alcohol es la sustancia psicoactiva más generalizada en la población de 15 a 64 años, seguido del tabaco, el cannabis y la cocaína en polvo (4). Un alto porcentaje de accidentes automovilísticos y delitos violentos están relacionados con el consumo de alcohol y el abuso de alcohol se asocia con comorbilidades médicas que afectan a numerosos sistemas corporales, incluyendo el SNC. El alcohol actúa en múltiples objetivos biológicos (altera la actividad de moléculas de señalización implicadas en el procesamiento sináptico, incluyendo la modulación del glutamato y del GABA) (9) y su consumo prolongado desregula profundamente circuitos neuroquímicos clave en el sistema de recompensa (dopamina, endocannabinoides) y en la respuesta del SNC con el estrés (factor liberador de corticotropina [CRF], Neuropeptido Y [NPY]) dentro del cerebro (10).

Neurofisiología del nucleus incertus, la relaxina-3 y su receptor, RXFP3

En 2013, se publicó un estudio (11) en el cual, usando un modelo de rata para el abuso de alcohol, demostraron que la administración de un antagonista para el receptor de un neurotransmisor, la relaxina-3 (RLN3), disminuía tanto la autoadministración de alcohol como la inducción de estrés secundaria a la falta de alcohol. RLN3 es un péptido de las familias de relaxinas e insulinas. Aunque se conoce una limitada expresión periférica de RLN3 (12), el principal lugar de expresión de RLN3 es el SNC, donde se ha detectado en múltiples especies, incluyendo el pez cebra (13), el ratón (14), la rata (15), el macaco (16) y el ser humano (17).

La expresión del ARNm de RLN3 se limita a un pequeño número de neuronas en el núcleo incertus (NI) del tronco del encéfalo (TE), pero su extenso patrón de proyecciones da lugar a una presencia generalizada de RLN3 en todo el SNC, con similar distribución en todas las especies estudiadas. Además, se han detectado unas pocas neuronas que expresan RLN3 en el rafe pontino, la parte ventral de la sustancia gris del acueducto y la

división lateral de la sustancia nigra (16)(18). Debido a que la rata y el ratón son las principales especies "experimentales", su patrón de expresión de RLN3 es el más estudiado. Existe una fuerte correlación entre las áreas que expresan el ARNm del receptor de RLN3, RXFP3, y las áreas que contienen el péptido RLN3. Además, la localización de la RLN3 parece conservarse evolutivamente, como se observa en el pez cebra (13).

Exámenes ultraestructurales del cerebro de rata han revelado inmunorreactividad a RLN3 presente en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi del NI y terminales sinápticos asociados a vesículas de núcleo denso en terminales con vesículas ovaladas y contactos simétricos propios de sinapsis inhibitoras en septum e hipotálamo (18)(19). Estas características sugieren que RLN3 se libera en la hendidura sináptica para actuar como un neurotransmisor (19).

El *nucleus incertus* o núcleo incierto (NI) fue descrito como una región en la línea media del suelo del cuarto ventrículo, un grupo celular en las regiones centrocaudales de la sustancia gris periventricular pontina, adyacente al borde ventromedial del núcleo tegmental dorsal caudal (20) (21). Sin embargo, en los últimos años, han surgido nuevas evidencias que señalan el papel que juega el NI en múltiples procesos cerebrales como la respuesta de estrés, la memoria y la emoción (22).

Tras la localización de RLN3 en el NI, estudios inmunohistoquímicos confirman que las neuronas RLN3-positivas son neuronas GABAérgicas (reflejadas por su co-expresión de GAD, la enzima sintetizadora de GABA) (21), es decir, que el NI contienen el neurotransmisor inhibitorio GABA, aunque el NI comprende un grupo distinto de neuronas GABA que tienen prominentes proyecciones más largas. Estudios anatómicos detallados confirman que estas neuronas GABAérgicas del NI tienen proyecciones dispersas sobre mesencéfalo, diencefalo y telencéfalo (21). Las neuronas del NI no parecen producir niveles significativos de marcadores para la transmisión de aminoácidos excitatorios, lo que sugiere que el papel principal de las neuronas del NI en la neurotransmisión es inhibitorio (11).

En las neuronas del NI se expresan varios neuropéptidos, incluyendo RLN3, neuromedina

B, colecistoquinina, calbindina y calretinina (estas dos últimas, proteínas ligadoras de calcio, normalmente co-localizadas con GABA), pero RLN3 es el más restringido al área (22) (21). Sobre esta base, se argumenta que el estudio de las funciones de RLN3 y sus interacciones con la transmisión GABA debe proporcionar importantes conocimientos sobre las funciones del NI.

El receptor para RLN3 es el receptor de péptido 3 de familia de relaxina (RXFP3), un receptor acoplado a proteína G que se acopla a proteínas Gi/o inhibitoras. Estudios *in vitro* utilizando células no neuronales que sobreexpresan RXFP3 han demostrado que se acopla a las proteínas G inhibitoras e inhibe la acumulación de cAMP (12). También se conoce como receptor acoplado a proteína G 135 (GPCR135) (12). La topografía regional de RXFP3 en el cerebro de la rata está fuertemente correlacionada con la distribución de las fibras RLN3-positivas (19). RXFP3 muestra alta afinidad por RLN3, RLN3 es el único miembro de la superfamilia de relaxinas que puede activar RXFP3 y los genes que codifican ambas proteínas parecen haber co-evolucionado filogenéticamente (12).

RXFP3 se expresa en varias regiones cerebrales relacionadas con el estrés, incluyendo el núcleo paraventricular (PVN), donde podría regular el factor liberador de corticotropina (CRF) y la vasopresina/oxitocina, reguladores críticos del eje del estrés en diferentes condiciones fisiológicas (23). La expresión de RLN3 se incrementa en las neuronas del NI por estrés neurogénico, como se ha observado en ratas al someterlas al test de natación forzada, estrés social, ejercicio en cinta ergométrica y estrés por inmovilización; situaciones que estimulan fisiológicamente la excitación y el estado de alerta. Además, la inyección central de RLN3 incrementa la actividad neuronal CRF en el PVN, sugiriendo un posible efecto de feedback positivo (15).

El análisis de los receptores expresados por las neuronas RLN3-positivas es importante, ya que proporciona información sobre las entradas neurales que reciben estas células y las vías centrales y estímulos que podrían regular la producción y liberación de RLN3. En este sentido, las neuronas RLN3-positivas del NI de la rata expresan receptores de CRF tipo 1 (CRT₁) (18) y responden con aumento de c-Fos y RLN3 tras la inyección de CRI intracerebroventricular (icv) o diferentes factores de estrés fisiológicos, como se ha comentado. Las neuronas neuronas RLN3-positivas del NI de la rata también expresan

receptores de serotonina tipo 1A (5HT_{1A}) (24), receptores metabotrópicos de glutamato tipo 3 (mGluR₃), receptores de orexina/hipocretina tipo 1 y 2 (OR₁ y OR₂) (25) y receptores de la hormona concentradora de melanina tipo 1 (MCH₁) (22). Estos dos últimos (OR y MCH) con una función orexígena.

Distribución neuroanatómica de fibras positivas para RLN3 y RXFP3; inputs y outputs del nucleus incertus

Las estructuras neuronales donde parece estar presente el péptido RLN3 son: en el NI pars compacta y pars dissipata (localizado en el tegmento pontino), en el adyacente núcleo pontino del rafe, de forma dispersa a lo largo de la extensión rostrocaudal de las regiones ventromediales de la sustancia gris periacueductal (PAG) y en la región lateral de la sustancia negra (22). Todas las neuronas RLN3-positivas en el NI parecen co-expresar GABA, como ya se ha comentado, pero las neuronas RLN3-positivas en otras regiones no han sido caracterizadas. Las fibras positivas para RLN3 y para RXFP3 están presentes dentro las áreas en las cuales se localizan las poblaciones de neuronas relacionadas con el grado de conciencia-actividad (*arousal*), sugiriendo que el sistema RLN3/RXFP3 actúa en paralelo con los sistemas colinérgicos y monoaminérgicos (15).

En un estudio de inmunoreactividad de RLN3 en cerebros de macaco rhesus y humano (17), en ambas especies, RLN3 se localizó en las neuronas del núcleo tegmental dorsal, núcleo del rafe dorsal, área tegmental ventrolateral, cerebelo y núcleo coclear ventral (17). Estos patrones no son coherentes con hallazgos en ratón (26) y rata (18).

Las principales aferencias (*inputs*) del NI provienen de la CPF medial, la COF, la corteza motora secundaria, el septum medial, el núcleo de la banda diagonal, el núcleo septofimbrial, la parte medial del habénula lateral, la zona inespecífica rostral, el núcleo preóptico ventrolateral, el núcleo supramamilar, el polo caudal del núcleo parafascicular del tálamo, el núcleo periacueductal, el núcleo interpeduncular, el núcleo medial de rafe, el extremo caudal del núcleo dorsal del rafe (DR), el núcleo prepósito y el NI contralateral (20).

Las principales eferencias (*outputs*) del NI van hacia el hipocampo, el núcleo septal medial y de la banda diagonal, la amígdala (núcleos basolateral, cortical, medial y el área amigdalohipocampal), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el núcleo talámico mediodorsal, el núcleo supraquiasmático, el área preóptica lateral, el hipotálamo lateral y posterior, el núcleo mamilar lateral (la corteza o *shell*), el núcleo supramamilar, el área tegmental ventral, el colículo superior (o tectum), el núcleo interpeduncular, el núcleo medial del rafe, el núcleo tegmental laterodorsal, las cápsulas que rodean los núcleos tegmentales dorsal y ventral, el núcleo dorsal del rafe, el núcleo prepósito y el núcleo accesorio de la oliva inferior. También hay estudios que muestran conexiones del NI con la CPF medial y la CCA (20)(21)(27). La CPF medial juega un papel principal en la modulación de las funciones cognitivas (sobretudo memoria de trabajo y flexibilidad cognitiva), mientras que la CCA es imprescindible en la modulación de la memoria del miedo (procesamiento del miedo, del dolor y estímulos de amenaza); y ambas estructuras son muy sensibles al estrés (28). Hay estudios que revelan que la estimulación del NI (tanto eléctrica como por infusión de CRF) disminuye la actividad de la CPF medial, pero aumenta la de la CCA (27). Tanto la CPF como la CCA forman parte del sistema de recompensa cerebral. Cabe destacar que muchas de las conexiones del NI proyectan a través del haz medial prosencefálico medial (21).

Datos farmacológicos consistentes han demostrado la capacidad de RLN3 exógena (y agonistas selectivos de RXFP3) para influir en la ingesta alimentaria y en el aumento de peso corporal en la rata (29). También hay evidencia experimental de acciones moduladoras asociadas con la excitación, el ritmo circadiano y los estados de sueño/vigilia, la memoria espacial y emocional, y las respuestas al estrés y al comportamiento emocional (15).

Modelos animales para el estudio de conductas adictivas

Para comprender los mecanismos neurobiológicos implicados en la adicción a través de los modelos animales, es necesario conocer el elemento inicial del proceso adictivo, el efecto reforzante inducido por la droga. En función del componente del refuerzo que deseemos estudiar podemos servirnos de un tipo de modelos animales u otros. Entre los

principales modelos animales utilizados para evaluar los efectos reforzantes de las drogas destacan modelos de refuerzo basados en el efecto hedónico primario que produce el consumo de la sustancia adictiva, como los modelos de autoadministración (AA) y autoestimulación eléctrica intracraneal (AEIC), o modelos basados en el componente relacionado con el aprendizaje asociativo y la capacidad cognitiva de realizar predicciones sobre la obtención del refuerzo en el futuro, como el modelo de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL). Para estudiar el papel que ejercen los estímulos condicionados a las drogas en el mantenimiento de la conducta adictiva el paradigma de CPL puede ser el más adecuado (30). El CPL es un paradigma que evalúa el efecto condicionado reforzante de las sustancias de abuso, ya que los estímulos contextuales (como el color o la textura del suelo del compartimento donde se recibe la droga) pueden adquirir propiedades apetitivas cuando se asocian con el estímulo reforzante primario, en este caso la sustancia de abuso (31). Para lograr este objetivo, se utiliza una caja con dos o tres compartimentos claramente diferenciados en cuanto a los estímulos que los componen. De esta forma los animales reciben la droga en un contexto ambiental con unas características determinadas, con el objetivo de evaluar más tarde si han aprendido la asociación entre las claves ambientales del lugar donde recibió la droga y el efecto reforzante que esta produce. Igualmente, mediante dicho paradigma se puede evaluar el proceso contrario, el condicionamiento de aversión de lugar (CAL) que se ha observado con dosis altas o la abstinencia de algunas drogas. También es útil para estudiar la reinstauración inducida por la re-exposición a las drogas, un proceso que está potenciado por el estrés.

Líneas de investigación del sistema RLN3/RXFP3

En cuanto a la adicción se han realizado grandes avances en el conocimiento de los procesos neurobiológicos que subyacen a esta. Sin embargo, hay aspectos cruciales del proceso adictivo que permanecen todavía sin resolver, como el deseo intenso de consumo o *craving*, que constituye uno de los mayores problemas durante la abstinencia, así como los mecanismos neurobiológicos y psicopatológicos que subyacen a las frecuentes recaídas en los hábitos tóxicos, que se presentan incluso después de mucho tiempo de abstinencia. Para que la adicción se desarrolle con todas sus consecuencias

deben confluír en un mismo individuo una vulnerabilidad previa al consumo de las sustancias y una configuración especial de los mecanismos neurobiológicos que induzca, con mayor facilidad, los procesos neuroadaptativos y de plasticidad neuronal característicos de la adicción.

Actualmente, múltiples estudios relacionan procesos como el estrés y la ingesta alimentaria con el NI, dada la actividad orexígena de RLN3 y su relación con otros neuropéptidos con función orexígena (orexina) o anorexígena (CRF) (32). Además, existen múltiples patologías (bulimia, anorexia purgativa) que muestran una relación inequívoca entre estrés e ingesta alimentaria compulsiva y desestructurada (6). Hay estudios que evidencian la mediación de la RLN3 en el incremento de la ingesta mediado por estrés (33). Otras patologías, como la obesidad, también podrían mostrar una relación con las conductas adictivas (34).

Se están realizando múltiples estudios que tienen como diana el NI, ampliando la información disponible acerca de las funciones que este puede desempeñar. El patrón de inervación del NI, la gran variedad de neuropéptidos y receptores (como 5-HT1A, D2 y CRF1) que expresa, junto con los hallazgos de que la RLN3 puede modular la ingesta de alimentos, las respuestas al estrés, la excitación y las interacciones con los sistemas CRF (11) conducen al planteamiento de que dicho sistema pueda modular aspectos del comportamiento relacionados con el uso y abuso de sustancias.

Por todo ello, esta revisión pretende poner en común los diferentes descubrimientos que ponen de manifiesto la implicación del *nucleus incertus* y su sistema de señalización RLN3/RXFP3 en múltiples procesos neurobiológicos que alteran el sustrato fisiopatológico de la adicción.

Material y métodos

La metodología propuesta para la realización de esta revisión se compone de tres fases: definición del problema, búsqueda y organización de la información, y análisis de la misma.

El problema que se plantea para la realización de este trabajo es la ausencia de una revisión actualizada acerca del sistema NI/RLN3/RXFP3 en relación con la adicción, es decir, que integre los avances que ha habido en neurobiología conforme a las bases de la adicción y de las nuevas estructuras implicadas, siendo el punto central de la revisión, el papel del NI en las conductas adictivas (o modelos de estudio de estas).

Una vez definido el problema a investigar, se consultaron diferentes fuentes de información, entre libros, tesis, revistas especializadas y artículos científicos; si bien para el proceso de investigación bibliográfica se ha contado principalmente con la búsqueda de artículos científicos a través del sistema de búsqueda PubMed, dado que es un motor de búsqueda que proporciona libre acceso a la gran mayoría de publicaciones de investigación biomédica mundial. Para la búsqueda inicial se han empleado las ecuaciones de búsqueda mostrada en las Tabla 1.

Ecuación de búsqueda	Filtros adicionales	Resultado
Nucleus incertus	Review	509
Relaxin-3	Review	30
Nucleus incertus AND addiction		66
Relaxin-3 AND addiction		3
Nucleus incertus AND Relaxin-3 AND addiction		1
RXFP3	Review	21
Relaxin-3 AND reward		8
Relaxin-3 AND RXFP3 AND reward		6
Nucleus incertus AND reward		137
Total		781

Tabla 1. Ecuaciones de búsqueda empleadas para la búsqueda principal de información.

Del total de artículos encontrados, se realizó en primer lugar una lectura inicial de las revisiones más actualizadas del tema y a partir de esta se ordenaron los artículos más recientes, dado que estos en su desarrollo incluyen las evidencias que se extraen de artículos (experimentos) previos. El NI es una estructura de la que se conocía muy poco, hecho evidente al darse cuenta de que ni siquiera aparece como tal en los principales libros de neuroanatomía humana. Se trata de una región principalmente definida y estudiada en roedores. Son relativamente pocos, a nivel mundial, los grupos de trabajo que estudian el NI; por ello, la literatura reproduce la cadena de hallazgos experimentales

añadiendo en las publicaciones más recientes los últimos avances, de forma que la lectura del total de la información acerca del sistema NI/RLN3/RXFP3 se puede hacer con la lectura de los artículos de los últimos 10-15 años.

La información fue organizada mediante la herramienta *Mendeley*. Esta combina *Mendeley Desktop*, aplicación como base de datos que permite ir añadiendo citas en *Word*, con el *plug in* para buscador *Google Chrome* de *Mendeley*.

Tras una primera lectura para asentar unos conocimientos generales de la materia, se observa que el problema planteado es cierto y que la literatura de revisión existente no presenta un punto de vista que “ordene” el conocimiento existente acerca del sistema NI/RLN3/RXFP3 en torno a la neurobiología de la adicción. Por otro lado, surge un nuevo problema, que es decidir que líneas de investigación están directa o indirectamente relacionadas con la adicción y de estas, cuales deben desarrollarse en el presente trabajo. De esta forma, en base a una mayor y/o más firme evidencia se decide profundizar en ritmo theta, conductas alimentarias y alcohol, así como en las vías de recompensa descritas, su relación con el sistema NI/RLN3/RXFP3, y la implicación de este en los procesos de *arousal* y estrés. En cuanto a los dos primeros, se observa que recientemente hay una tendencia a relacionar estos dos procesos con la fisiopatología de la adicción. Por otro lado, es mayoritario el número de experimentos que utilizan el alcohol como sustancia psicoactiva adictiva en el estudio del sistema NI/RLN3/RXFP3. Por ello, para la segunda búsqueda se han utilizado las ecuaciones de búsqueda que incluían los términos: *nucleus incertus* o *relaxin-3* combinados con *theta rhythm*, *alcohol*, *arousal*, *stress*, *bulimia*, *food intake*, *habenula*, *nucleus accumbens*, *ventral tegmental area*. A posteriori, se seleccionaron como en la primera búsqueda los artículos más recientes.

Conforme se fue realizando esta segunda lectura, más específica, se fue realizando un primer borrador de este trabajo, lo cual permitió comenzar a entender de forma global diversas evidencias descritas y observar también la necesidad de hacer pequeñas búsquedas accesorias (una tercera búsqueda más disgregada) para rellenar pequeños huecos en la realización del trabajo.

En general, se realizó un análisis sobre los principales artículos con las ideas más importantes y los aspectos más relevantes para el tema de estudio, mediante la lectura de los resúmenes y conclusiones de dichos artículos. A continuación se realizó un análisis crítico de los artículos de mayor interés y sobre los cuales se desarrolla el trabajo.

Resultados

Vías de recompensa y adicción

Estudios experimentales sobre roedores han puesto de manifiesto que la administración aguda de psicoestimulantes, alcohol y opiáceos provoca un incremento en la actividad del sistema dopaminérgico de la recompensa (35). En este sentido, las sustancias adictivas se comportan de manera similar a las recompensas naturales (la bebida, el sexo o las relaciones sociales); sin embargo, a diferencia de éstas, las sustancias adictivas inducen sensibilización dopaminérgica, sobre todo cuando se consumen de forma repetida e intermitente.

El consumo crónico de sustancias adictivas favorece el desarrollo de cambios neuroadaptativos que afectan a distintos niveles del sistema dopaminérgico. La sensibilización inducida por el consumo crónico de drogas, en especial por los psicoestimulantes, regula al alza de los receptores D1 durante los primeros días de abstinencia, implicando tanto al NA como al estriado dorsal. Se ha asociado también un aumento de la respuesta de los receptores D1, que persiste durante un mes después del inicio de la abstinencia (36). Por otro lado, se ha descrito una regulación a la baja de los receptores D2. Se ha relacionado un subtipo de receptores de la familia D2, los receptores D3, con la sensibilización dopaminérgica asociada a la administración repetida de estimulantes (37). Los receptores D3 están presentes normalmente en el *shell* del NA, pero no lo están o se expresan en má proporción en el *core* del NA y en las regiones dorsales del estriado. La disminución en la expresión de los receptores D2 en pacientes adictos podría preceder a la adicción y estar presente antes del primer contacto con la droga (38). En pacientes dependientes, la disminución de la densidad de D2 persiste después de varios meses de abstinencia. La disfunción de los receptores D2 podría estar

en la base de lo que se ha denominado 'síndrome de déficit de recompensa', que predispondría a las conductas adictivas como un intento de compensar la sensación básica de malestar. No puede descartarse la coexistencia simultánea de fenómenos de sensibilización en estos receptores (regulación al alza), sobre todo durante las primeras fases de la abstinencia. La sensibilización de los receptores dopaminérgicos, que afectaría principalmente al subtipo D3, quedaría enmascarada por procesos de neuroadaptación con una regulación a la baja de D2 y, posiblemente también, por la coexistencia de una expresión disminuida de D2, genéticamente determinada, que podría actuar como factor de vulnerabilidad para la adicción (37).

La CPF está implicada en los aspectos motivacionales de la conducta dirigida a objetivos y su alteración funcional puede explicar, en parte, la conducta compulsiva de búsqueda de droga que caracteriza la adicción. El predominio de la actividad D1 favorece un estado inhibitorio en el que sólo los estímulos más fuertes pueden provocar activación y motivar la conducta. En estas condiciones, en pacientes adictos, sólo la droga y los estímulos asociados a la droga (y no los reforzantes naturales) son suficientemente fuertes para provocar la liberación de la dopamina necesaria para activar la CPF y sobrepasar la inhibición producida por el predominio de la activación de los receptores D1. Los cambios en la función del sistema dopaminérgico en el CPF son responsables de algunas de las alteraciones cognitivas propias de la adicción, como la falta de flexibilidad cognitiva y la dificultad para cambiar el foco de atención. Estas alteraciones están también presentes en otros trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia. La infusión de agonistas de los receptores dopaminérgicos D1 en el CPF medial normaliza los déficit conductuales en ratones sometidos a un programa de sensibilización con anfetamina (39).

Los estímulos ambientales que preceden a la administración de la droga (o refuerzo) pueden convertirse en estímulos condicionados a través de un proceso de condicionamiento. La presencia del estímulo condicionado provoca un aumento selectivo de dopamina extracelular en el *core*, pero no en el *shell*. Existen evidencias de que el *shell* es el responsable del procesamiento de los reforzantes primarios (comida, drogas...) mientras que el *core* estaría implicado en los efectos condicionados a través de las conexiones de esta estructura con la amígdala (35). La amígdala es una estructura estratégicamente situada para el procesamiento de los estímulos condicionados, ya que

recibe proyecciones dopaminérgicas procedentes del ATV, que se proyectan sobre el *core* del NA.

La conducta de consumo de las drogas es, en fases iniciales, una acción instrumental, motivada y dirigida a un claro objetivo: la obtención de placer, bienestar y euforia, proporcionados por la droga. Sin embargo, con el tiempo y el entrenamiento, las acciones inicialmente dirigidas a objetivos se transforman en habituales, activadas por mecanismos estímulo-respuesta, y adquieren la forma de un hábito de conducta. En esta segunda fase, el control de la conducta, determinado inicialmente por la actividad del CPF, se va transfiriendo progresivamente a la actividad de los núcleos subcorticales a través de los circuitos corticoestriatocorticales, que controlan la conducta de manera automática. La estructura del sistema nervioso directamente implicada en la formación de hábitos de conducta con inclusión de los hábitos asociados al consumo de drogas, es el estriado dorsal (40). En esta situación, el consumo de la droga se mantiene a pesar de que el objetivo último de la conducta (obtención de placer) se ha devaluado y la conducta ya no está bajo el control voluntario por parte del sujeto. La alteración funcional del CPF, debida en parte al desequilibrio funcional entre los receptores dopaminérgicos D1 y D2, favorece el establecimiento del hábito compulsivo de consumo. Se ha sugerido que la conducta persistente, compulsiva, de búsqueda de la droga en pacientes adictos depende, en gran medida, del estriado dorsal (41).

Cambiando de vía neural, es importante comentar que hay un creciente interés en la comprensión del papel de la habénula (Hb) en el procesamiento de recompensas, así como la regulación del afecto y los comportamientos dirigidos a metas (42). La Hb es una región del cerebro que, con la glándula pineal, forma el epítalamo. La Hb se localiza dorsalmente a lo largo del tercer ventrículo cerca de la región dorso-medial del tálamo y se divide principalmente en dos regiones: la Hb medial (HbM) y la Hb lateral (HbL). La HbL es una estructura de relé y su función está principalmente relacionada con la supresión de la actividad motora (43). Sin embargo, varios estudios han mostrado que la HbL está involucrada en otras funciones cerebrales, tales como recompensa, aversión, cognición, comportamiento materno, sueño y ritmos circadianos, y en disfunciones cerebrales, como la adicción, depresión y esquizofrenia (44).

Las neuronas de la HbL, que son principalmente glutamatérgicas, se activan mediante señales de aversión, una acción sin recompensa o un error de predicción (es decir, una ausencia de recompensa esperada), y son inhibidas por una recompensa esperada o inesperada (45). Curiosamente, las neuronas dopaminérgicas del ATV se comportan al revés en presencia de una recompensa o un estímulo aversivo. Las proyecciones de glutamatérgicas de la HbL terminan sobre todo en el núcleo tegmental rostromedial (TRM), que es un núcleo de GABAérgico que inhibe al ATV. Por lo tanto, el circuito HbL-TRM-ATV predice resultados tanto apetitivos como aversivos. También hay unas pocas fibras glutamatérgicas de la HbL que inervan directamente las neuronas dopaminérgicas del ATV, que modulan la actividad de la CPF para impulsar la aversión (46). La ingesta de cocaína tiene un efecto inicial gratificante, que depende del circuito de dopaminérgico al NA, que es seguido por un efecto negativo en el que el glutamato podría desempeñar un papel importante (47). Los animales con ablación de la HbL no extinguen el comportamiento de búsqueda de drogas, además, la ingesta de cocaína no se ve afectada; lo que sugiere que los animales no son capaces de disminuir la búsqueda de drogas incluso si no hay efectos más gratificantes. Por otro lado, el consumo voluntario de etanol es mayor en las ratas con lesiones de la HbL que en los animales control simulados (61). Esto demuestra el importante papel de la HbL en la regulación de los comportamientos dirigidos por drogas y en la mediación de los efectos de la ingesta de drogas.

Es interesante comentar a continuación que también se ha demostrado una implicación de la Hb en la regulación del sueño y los ritmos circadianos (45). El papel circadiano de la HbL se postula que es inhibitorio para las neuronas dopaminérgicas en un momento específico durante el ciclo de 24 horas. En ratas, el pico de actividad eléctrica de la HbL ocurre durante el día, cuando la liberación de dopamina en el cuerpo estriado es baja (48). En los ratones, hay un ritmo circadiano con una actividad de disparo de la HbL con un pico en la noche, lo que se correlaciona con actividad eléctrica baja en el ATV (49). Puesto que la actividad de la HbL controla la actividad neuronal de DA, también es posible que la HbL module comportamientos rítmicos relacionados con la ingesta de drogas a través de la regulación del sistema dopaminérgico. De hecho, la sensibilización conductual se ve alterada cuando se lesiona la HbL en las ratas (48). Esto sugiere que el reloj de la HbL podría modular los patrones rítmicos de sensibilización conductual. Por

otra parte, la auto-administración de cocaína muestra un ritmo diario en fases (con un máximo en la noche) con el pico de liberación de DA en el estriado. Tanto la autoadministración como la liberación de DA están correlacionadas con una mayor actividad de disparo de HbL (48). Es importante destacar que la ingesta crónica de cocaína es capaz de interrumpir los ritmos circadianos (50).

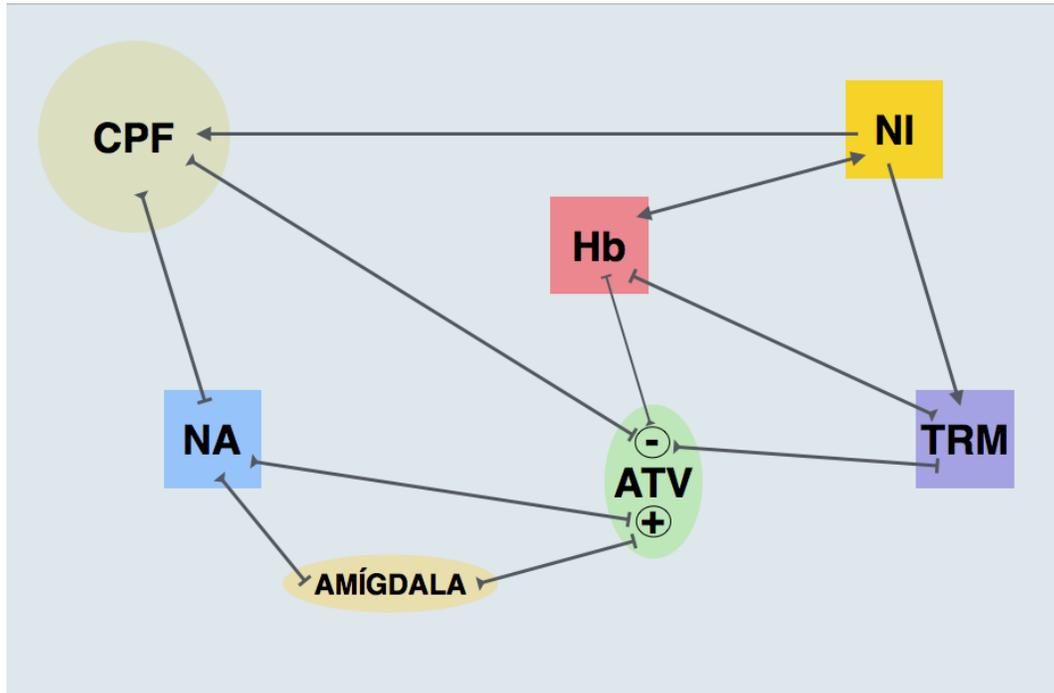


Figura 2. El ATV envía proyecciones dopaminérgicas al NA, produciendo una estimulación de este frente a un estímulo de recompensa y el NA, a su vez, proyecta a la CPF (vía de la recompensa). La amígdala recibe proyecciones dopaminérgicas del ATV y proyecta sobre el NA (modulación de los estímulos condicionados). El Hb envía proyecciones glutamatérgicas para estimular al TRM (núcleo inhibitorio del ATV) frente a un estímulo aversivo, y el TRM envía proyecciones GABAérgicas inhibitorias al ATV (esta situación confecciona la vía de la aversión). Además, existen unas pocas proyecciones del Hb al ATV (modulación de la actividad de la CPF para impulsar la aversión). El NI presentaría proyecciones unidireccionales con la CPF y el TRM, y con Hb presenta un patrón de proyecciones recíproco a y desde la división medial de la HbL lateral.

Implicación del *nucleus incertus* en los procesos de consciencia (*arousal*) y estrés

Arousal se refiere a un comportamiento fundamental de los animales y los seres humanos que implica un mayor estado de alerta a los estímulos sensoriales, el aumento de la

actividad motora y el aumento de la reactividad emocional. Los niveles de excitación varían típicamente de forma cíclica durante el ciclo de sueño-vigilia de 24 horas, pero varios eventos, incluyendo la exposición a un factor de estrés, pueden aumentar rápidamente los niveles de excitación. El NI proyecta a muchas áreas cerebrales asociadas con la excitación y estudios recientes proporcionan evidencia de que el NI puede modular los niveles de excitación en las fases de vigilia (28). Se ha observado que la expresión de ARNm de relaxin-3 en el NI varía durante el ciclo de 24 h, con un pico a las 20:00h (durante la fase oscura/activa) y una disminución a las 08:00h (fase de luz/inactiva) (22). Estos datos son consistentes con la idea de que las neuronas del NI y la relaxina-3 están más activas durante la fase activa (o *arousal*) del ciclo luz/oscuridad. Cabe mencionar que la señalización de relaxin-3/RXFP3 puede incidir directa o indirectamente en la vía común de recompensa dopaminérgica (ATV, NA) y regiones límbicas relacionadas incluyendo la amígdala; y estudios preliminares en ratones KO de relaxina-3 sugieren que la relaxina-3 puede modular comportamientos motivados (15).

Las vías neurales de *arousal* en el cerebro están asociadas con la modulación del comportamiento de acuerdo con los requerimientos ambientales y el punto clave en la regulación del *arousal* es el área septal. Estudios de definición de vías neurales de la rata han demostrado que el área septal es diana de proyecciones ascendentes desde el NI (24). El NI en la rata presenta una fuerte expresión de CRF₁; de hecho, en la rata, las neuronas RLN3-positivas co-expresan CRF₁, aunque no constituyan el total de la población neuronal CRF₁-positiva (51).

Se ha demostrado que la inyección intracerebroventricular de CRF activa el NI dos horas tras la inyección. Se ha demostrado a su vez varios factores psicológicos agresivos, que se supone que aumentan la liberación de CRF dentro del cerebro, activan el NI (22). Se desconoce la fuente de CRF que activa las neuronas del NI bajo condiciones estresantes (podría ser el PVN del hipotálamo o la amígdala central, o por un *input* neural desconocido). Varios estudios han identificado condiciones de estrés que activan el NI, utilizando el marcador comúnmente utilizado para la activación neuronal, el gen de activación inmediata, c-fos, y su producto proteico, Fos (22).

Grupo celular	Fos inducido por CRF	ARNm de CRF	ARNm de CRF ₁	ARNm de CRF ₂
Sustancia gris periacuductal	++	++	+	+
Área tegmental ventral	+	+	++	-
Nucleus incertus	+	++	++++	-
Núcleo tegmental laterodorsal	++	++	++++	-
Locus coeruleus	-	-	-	-

Tabla 2. Distribución e intensidad de la expresión de Fos inducida por CRF en relación a la expresión del ARNm de los receptores de CRF tipo 1 y tipo 2. (52)

Dado el hecho de que las fibras positivas para RLN3 en el NI poseen receptores CRF₁, responden a CRF y están activadas por estresores; el NI podría modular el ritmo theta y comportamientos motivaciones durante episodios de estrés. De hecho, estresores como el test de la natación forzada inducen un incremento de la expresión de RLN3 dependiente de CRF₁ en las neuronas del NI (19). De esta forma, la activación del NI por CRF es una forma de comunicar información relacionada con el estrés a centro cognitivos y emocionales en el cerebro vía NI/RLN3/RXFP3.

Existe una incongruencia inicial entre el papel propuesto de la RLN3 como activador conductual y su co-expresión del neurotransmisor inhibitor GABA. La evidencia electrofisiológica apoya un efecto inhibitor de RLN3 mediante la activación de RXFP3 en áreas como el DR, donde el NI puede lograr una mayor "activación conductual" mediante la inhibición directa de las neuronas DR (22). Pero también explica la inhibición de la depresión conductual, ya que en áreas tales como la región dorsolateral de la PAG, el NI puede lograr una mayor activación conductual por "desinhibición" de interneuronas inhibitoras.

La distribución de RLN3/RXFP3 en circuitos límbicos clave sugiere que análogos de RLN3 exógenos y/o la señalización endógena de RLN3 puede modular la excitación, el estado de ánimo y la recompensa. Se ha informado que el agotamiento crónico "global" de la serotonina cerebral aumenta el ARNm de la RLN3 en el NI, lo que sugiere una posible regulación inhibitoria de las neuronas de RLN3 mediante la transmisión de serotonina

(mediada por 5HT_{1A}). La función del receptor 5HT_{1A} está fuertemente implicada en comportamientos de tipo depresivo. Estudios preliminares sugieren que la señalización de RLN3/RXFP3 puede modular el comportamiento depresivo (15). La expresión del gen de RLN3 en el NI aumenta significativamente tras la depleción de 5-HT. También se ha observado la localización de receptores 5-HT_{1A} en neuronas positivas para RLN3 de la NI (24). Esto sugiere que 5-HT regula negativamente la expresión del gen de RLN3 en el NI. Tras el agotamiento de serotonina producido por la administración de p-clorofenilalanina (inhibidor selectivo e irreversible de la enzima triptófano hidroxilasa, enzima limitadora de la velocidad en la biosíntesis de la serotonina, con la consecuente depleción endógena de serotonina), hay un aumento significativo en la expresión del ARNm de RLN3 en el NI (24). Por ello, se puede afirmar que el desarrollo del NI depende de la actividad serotoninérgica.

En un estudio con ratones *knockout* (KO) para RLN3 se observó que los ratones KO femeninos mostraron hipoactividad y tuvieron menos encuentros con un ratón desconocido. Por otro lado, se ha observado una correlación positiva, los KO masculinos mostraron una "hipersensibilidad" al estrés y perdieron un porcentaje significativamente mayor de su peso corporal en respuesta a un régimen de estrés crónico de 8 semanas (14). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la señalización de RLN3 contribuye al control central de la excitación, el comportamiento exploratorio y las respuestas al estrés.

El NI responde al estrés e influye en la plasticidad de la vía hipotálamo-CPF bajo condiciones de estrés. El enlace entre el hipotálamo y la CPF está implicada en varios aspectos de la cognición y la plasticidad en la vía hipotálamo-CPF ha sido un modelo especialmente útil para estudiar el estrés. Hay estudios que sugieren claramente que los receptores de CRF en el NI contribuyen al deterioro de la plasticidad inducida por el estrés en la vía hipotálamo-CPF; de forma que, se propone que la conectividad NI-hipotálamo-CPF forma una "vía" que responde al estrés y que el antagonismo de CRF₁ en el NI podría mejorar el deterioro relacionado con el estrés en la cognición (53).

Se ha demostrado en un estudio, mediante el uso de vectores virales para el silenciamiento de RLN3 como forma de generar un modelo de rata adulta para investigar la función endógena de RLN3, que reducciones significativas en la expresión de RLN3 no

genera efectos neuronales o de comportamiento perjudiciales de base, no detectándose ningún fenotipo de comportamiento en los paradigmas probados (54). Las pruebas conductuales se realizaron bajo condiciones típicamente asociadas con un tono neuropéptido bajo, lo que puede producir consecuencias funcionales menos dramáticas que los escenarios de tonos altos (situaciones con estrés).

Muchos de los circuitos neuronales involucrados en la mediación de comportamientos y trastornos complejos como ansiedad, depresión, adicción y comportamientos sociales disfuncionales implican la activación de la amígdala en conjunción con circuitos corticales y del hipocampo. Las proyecciones subcorticales ascendentes proporcionan entradas moduladoras a la amígdala. Uno de estos aportes se origina en el NI, cuya señalización mediante RLN3 ha sido implicado en la modulación de la recompensa/motivación y la ansiedad y comportamientos depresivos en los roedores a través de acciones dentro de la amígdala (55). Se ha demostrado la existencia de proyecciones del NI a núcleos específicos de la amígdala, en consonancia con un papel probable para este sistema de excitación integrador putativo en la regulación de los comportamientos sociales y emocionales dependientes de la amígdala (55).

El NI expresa una variedad de neurotransmisores, neuropéptidos y receptores tales como receptores 5-HT_{1A}, D₂ y CRF₁. La buspirona es un ansiolítico que es un agonista parcial del receptor 5-HT_{1A} y un antagonista de los receptores D₂. Varios estudios preclínicos han informado de un efecto bifásico de modulación de la ansiedad de la buspirona. El efecto ansiogénico se ha reproducido en un estudio mediante la infusión directa de buspirona en el NI, pero se abolió en las ratas con lesión tipo NI-CRF-saporina, lo que indica que el NI está presente en los circuitos neuronales que conducen el comportamiento ansiogénico (56). Esto lleva a la conclusión de que 5-HT_{1A} en el NI contribuyen al efecto ansiogénico de una dosis alta aguda de buspirona en ratas y puede ser funcionalmente relevantes para la ansiedad fisiológica.

Ritmo theta y *nucleus incertus*

Los estados comportamentales corticalmente activos, ya sea por un nivel elevado de activación generalizada (*arousal*) o durante la exploración, se correlacionan con la aparición de la oscilación theta hipocámpica (57). El NI es un núcleo clave de los circuitos del TE involucrados en la ritmicidad hipocámpica theta, ya que las oscilaciones hipocámpicas theta tras la activación sensorial muestran una dependencia con la actividad neuronal del NI, que podría desempeñar un papel clave en el establecimiento de condiciones óptimas para la codificación de la memoria (58).

Hay estudios que postulan que el NI es un importante área en la modulación, CRF mediada, del ritmo theta del hipocampo a través de una transmisión GABA/RLN3 (59). CRF es liberado por las poblaciones neuronales para mediar las respuestas adaptativas al estrés autonómica y comportamental. Este mismo estudio ha demostrado que mayoría de las neuronas activadas por CRF en el NI contienen RLN3 (59). Se sabe que en el NI hay una alta densidad de receptores CRF₁ y una baja expresión de ARNm de CRF₂ (60). Los resultados *in vitro* demuestran que la activación de las neuronas del NI por CRF depende de la unión y activación a CRF₁, lo cual es consistente con los efectos postsinápticos directos en CRF₁. También se ha visto una población neuronal que no expresa CRF₁ ni contienen RLN3 y que se inhibe con la administración exógena de CRF *in vivo*. Sin embargo, *in vitro* no se observó una población equivalente, lo que sugiere la existencia de *inputs* inhibitorios extrínsecos distantes que son estimulados con la administración de CRF icv, pero que no estarían presentes en las preparaciones *in vitro*. El núcleo dorsal del rafe serotoninérgico podría ser un potencial input inhibitorio, ya que las neuronas serotoninérgicas y sus fibras se entremezclan con las neuronas RLN3-positivas del NI que expresan los receptores 5HT_{1A} (24).

Los estudios que han revelado la distribución de las neuronas del NI han demostrado que estas inervan otras regiones cerebrales involucradas en la ritmogénesis theta del hipocampo, que son el núcleo medial del rafe, el núcleo supramamilar y el propio hipocampo, particularmente el hipocampo ventral (20) (21). Las neuronas del NI son estimuladas por la actividad theta del hipocampo y se ha visto que las lesiones del NI

detienen dicha actividad theta, lo que sugiere que el NI media en la inducción de esta actividad oscilatoria TE (59). La infusión de agonistas y antagonistas de RXFP3 en el septum medial inducen o atenúan la actividad de la theta del hipocampo, y la infusión de antagonista de RXFP3 da como resultado un deterioro, dosis-dependiente, de la memoria de trabajo espacial (16). En condiciones normales y de bajo estrés, el tono endógeno de RLN3 puede ser bajo y, por tanto, a la luz de los hallazgos actuales de que el CRF es un activador de las neuronas RLN3, la evaluación del comportamiento durante el tono RLN3 endógeno elevado inducido por el estrés crónico o la administración de CRF puede ayudar en el estudio del papel de RLN3 (18) (61).

En el hipocampo, su estado "activo" se refleja por oscilaciones altamente rítmicas del potencial en frecuencia theta (4-10 Hz) (62). Estas oscilaciones han sido ampliamente descritas por estar relacionadas con la integración sensorio-motora, la navegación espacial y la memoria (63).

Las neuronas NI conectan el núcleo reticular ponto oral (RPO), identificado como el principal activador de la oscilación. Hay un estudio que demuestra que la estimulación de RPO aumenta la tasa de descarga de las neuronas del NI en ratas anestesiadas y que la lesión del NI suprime la actividad theta del hipocampo estimulada por el RPO (64). Esos resultados sugieren una proyección de RPO a NI y proporcionan la primera evidencia anatómica de una vía ponto-septal a través del NI que contribuye a la generación y modulación de la actividad theta del hipocampo.

La activación del NI induce ritmicidad theta en el área CA1 del hipocampo. La actividad theta hipocámpica sostenida, provocada por la estimulación RPO o por activación sensorial, conduce a una actividad diferencial de las neuronas del NI. Además, la inactivación o lesión del NI bloquea el ritmo theta inducido por estimulación de RPO (57). Durante los períodos de actividad theta hipocámpal, el potencial local de NI presenta un patrón theta oscilante sincronizado y, más específicamente, una subpoblación de neuronas NI muestra actividad de disparo theta acoplado a ondas theta hipocámpales (65). Otros estudios han evidenciado una proporción de neuronas del NI cuyo disparo se acopla a la teta del hipocampo después de la infusión local de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el NI (59). Las neuronas del NI pueden, por tanto, ser sensibles al

estrés y estar involucradas en la integración de procesos emocionales y cognitivos en relación con este. Estos hallazgos llevan a la conclusión de que existe una interacción bidireccional significativa entre el NI y el hipocampo en estado theta, provocado por la estimulación sensorial. NI podría ser considerado un núcleo relevante en el inicio de la actividad theta en presencia de acontecimientos estresantes, como la estimulación sensorial. En consecuencia, su sensibilidad al CRF hace que el NI responda al estrés y la excitación (20).

También se ha descrito que existen proyecciones ascendentes y descendentes de septum medial y el complejo de la banda diagonal, así como del septum posterior al NI, que pueden representar el sustrato neural para la regulación por parte del NI del ritmo theta del hipocampo (66). Se ha demostrado que los componentes de las proyecciones ascendentes al hipocampo están conectados bidireccionalmente (66), algunos por sistemas inhibidores, lo que plantea la posibilidad de un sistema auto-regulador.

La conducta alimentaria como modelo comparativo a la enfermedad adictiva

Los trastornos de la conducta alimentaria y de la ingesta de alimentos se caracterizan por una alteración persistente en la alimentación o en el comportamiento relacionado con la alimentación que lleva a una alteración en el consumo o en la absorción de los alimentos y que causa un deterioro significativo de la salud física o del funcionamiento psicosocial. Algunos individuos con trastornos de la conducta alimentaria refieren síntomas similares a los que suelen atribuirse a las personas con trastornos por consumo de sustancias, como el ansia y los patrones de consumo compulsivo (6). Esta semejanza puede reflejar la implicación de los mismos sistemas neuronales, como los relacionados con la regulación del autocontrol y la recompensa, en los dos grupos de trastornos.

La ingesta compulsiva se encuentra frecuentemente estimulada por el estrés (32). El sistema RLN3/RXFP3 está implicado en respuestas neurobiológicas al estrés así como a las conductas alimentarias. La expresión de CRF y RLN3 se ve afectada por el estrés, y estos neuropéptidos producen efectos opuestos sobre la alimentación (anorexígeno y

orexígeno, respectivamente). Todo esto supone la base sobre la que teorizar acerca de la posible intervención del NI en la vía de la alimentación. En relación con esto, y sabiendo que el sistema de recompensa natural forma parte de la base conductual de la alimentación se puede sugerir la relación del NI con las conductas adictivas, que utilizan esta vía de recompensa dopaminérgica. Para ello, podemos tomar como modelo de estudio la ingesta compulsiva, que afecta al 4,5% de la población general y es un síntoma básico en trastornos por atracón, bulimia nerviosa y el subtipo purga de la anorexia nerviosa (6). La ingesta compulsiva se caracteriza por el consumo excesivo de alimentos en un breve período de tiempo en el cual uno no se siente hambriento.

Se ha investigado los efectos específicos para cada sexo en cuanto a situaciones de estrés repetido y restricción en la ingesta de alimentos, así como el peso corporal, los niveles plasmáticos de corticosterona y la expresión CRF en el hipotálamo y de RLN3 en el NI (67). El estrés crónico y la restricción alimentaria repetida aumentan la ganancia de peso corporal en ratas hembra pero no en ratas macho. Las ratas hembra con restricciones crónicas de alimento muestran una hiperproducción de corticosterona plasmática e hipoproducción de CRF en el PVN. Además, las ratas hembra con una restricción alimentaria crónica expresaron niveles más altos de RLN3 en el NI y de CRF en la región medial del área preóptica del hipotálamo. El desequilibrio central en la menor producción del neuropéptido anorexígeno CRF en el PVN y una mayor producción de RLN3 orexígena en el NI pueden favorecer una ingesta excesiva y el aumento de peso corporal en las ratas hembra con restricciones alimentarias crónicamente estresadas. Por ello, RLN3 tiene un efecto específico para cada sexo en la ingesta de alimentos y la regulación del peso corporal. Mientras que RLN3 aumenta la ingesta de alimentos y el peso corporal tanto en machos como en hembras, las ratas hembras son más sensibles a los efectos de RLN3 y muestran una estimulación más fuerte de la alimentación y una mayor ganancia de peso corporal en respuesta a la administración de RLN3 (68).

El acceso intermitente a alimentos sabrosos (que actuarían como sustancia de recompensa) puede inducir una ingesta compulsiva en roedores en condiciones no estresantes alterando la neurotransmisión de dopamina y opioides en el sistema de recompensa del cerebro (a un nivel similar al que producirían las sustancias psicoactivas). Se ha observado que la alimentación compulsiva inducida por el estrés puede depender

de los efectos de CRF₁ y la señalización orexina (32). En un estudio se utilizaron ratas hembras jóvenes para desarrollar un modelo de ingesta compulsiva caracterizado por un consumo elevado de azúcar en condiciones no estresantes y un aumento adicional significativo en la ingesta de azúcar en respuesta al estrés (33). Los resultados muestran que las ratas con un comportamiento de ingesta compulsiva muestran un aumento en la expresión de ARNm de RLN3 en el NI y de ARNm de RXFP3 en el PVN. El aumento en la ingesta de azúcar mediada por estrés en dichas ratas se detuvo mediante la administración central de un antagonista de RXFP3, lo que sugiere una participación de la señalización RLN3/RXFP3 en los atracones inducidos por estrés.

También se ha estudiado la regulación de RLN3 y RXFP3 en el cerebro de ratas obesas por inducción dietética (mediante dietas de alto índice calórico en ratas con fenotipos para una rápida inducción de obesidad y ratas con un fenotipo resistente a la obesidad) (34). Hay asociaciones importantes entre la obesidad y ciertos trastornos mentales (trastorno de atracones, trastornos depresivo y bipolar, y la esquizofrenia) (6). Se ha visto que la expresión de mRNA de RLN3 en la parte medial del NI es mayor en ratas obesas inducidas por la dieta en comparación con las ratas de fenotipo resistente a la obesidad. La expresión más fuerte de RLN3 se acompaña de una disminución de la expresión de ARNm de RXFP3 en las ratas con obesidad inducida por la dieta. Por otro lado, la privación de alimentos aumenta los niveles de expresión de RLN3 en el NI en las ratas con fenotipo resistente a la obesidad, pero no afecta la expresión de RLN3 en el fenotipo obeso. La reintroducción de alimento aumenta rápidamente la expresión de RXFP3 en las ratas obesas a los niveles observados en el fenotipo resistente. Estos resultados proporcionan evidencia de que la realimentación después de la privación de alimento puede aumentar los efectos orexigénicos de RLN3 en ratas obesas mediante la rápida regulación positiva de la expresión del receptor RXFP3 de RLN3 en regiones específicas del cerebro implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos. Un incremento de la expresión de RLN3 en el NI y un aumento de la expresión de RXFP3 regiones cerebrales específicas pueden estar implicados en el aumento de la ingesta de alimentos.

Se sabe que el sistema dopaminérgico, la señalización glutamatérgica, el sistema opioide y la actividad cortical desempeñan papeles similares en la bulimia nerviosa y enfermedad adictiva. Estas similitudes son especialmente evidentes para los atracones de azúcar. Una

situación de atracón de azúcar y posterior privación da como resultado una disminución de los niveles de dopamina en el NA tras el ayuno y una mayor liberación tras el consumo de alimentos dulces (69). Combinado con un aumento de los receptores D1 post-sinápticos, esta liberación de DA mejorada sirve probablemente para sensibilizar a los animales a los efectos gratificantes de los alimentos dulces y/o las señales asociadas con el consumo de dichos alimentos. La evidencia preliminar también indica que las adaptaciones glutamatérgicas en el NA tras una “historia de atracones” da lugar a una respuesta mayor en esta región a las señales asociadas con alimentos sabrosos. Estas adaptaciones también se producen en animales con antecedentes de autoadministración adictiva de sustancias psicoactivas.

Alcohol y *nucleus incertus* en el estudio de las conductas adictivas

La exposición crónica al alcohol y otras drogas de abuso provoca muchos cambios neuroadaptivos en el cerebro, incluyendo la regulación positiva y negativa de los neuropéptidos y sus receptores, particularmente los que modulan las funciones relacionadas con el estrés, incluyendo al CRF, las urocortinas (1-3) y sus receptores afines (CRF₁ y CRF₂) (70). Se ha propuesto que un reclutamiento de mecanismos de CRF/urocortina (proteína anorexígena que pertenece a la familia de los factores liberadores de corticotropina y que está estructuralmente relacionada con el CRF) es más prominente en individuos con mayor sensibilidad y/o vulnerabilidad para los efectos inducidos por el alcohol (71). Tras una exposición crónica al alcohol, las ratas presentan actividad hiperactiva extra-hipotalámica de CRF. Consistentemente, el aumento de la búsqueda de alcohol y la ingesta pueden atenuarse tras la administración de antagonistas de CRF₁, particularmente en animales con antecedentes de alcohol (72). Los hallazgos actuales confirman estudios previos de que el bloqueo de CRF₁ reduce eficazmente el consumo aumentado de alcohol, al tiempo que sugieren que los efectos del acceso intermitente al consumo de alcohol pueden requerir la interacción CRF con dopamina en el ATV (73).

La señalización de RLN3 parece actuar vía RXFP3 como un regulador positivo de la recompensa en las ratas que prefieren el alcohol. Hay evidencia de que el antagonismo farmacológico de RXFP3 disminuye la autoadministración de alcohol y atenúa la recaída

inducida por estrés (11). Este hecho indica un papel de RLN3 en el procesamiento de las recompensas, lo que demuestra un grado de especificidad entre el alcohol y las recompensas naturales. A su vez, se ha identificado una correlación positiva entre el nivel de ARNm de RLN3 detectado en el NI y la ingesta diaria de alcohol (70). Esto apoya la hipótesis de que los niveles de RLN3 en el NI pueden regular la ingesta voluntaria de sustancias gratificantes. Los niveles de ARNm de RLN3 no fueron notablemente elevados o disminuidos por el consumo crónico de alcohol, sino más bien predispuestos en las ratas a consumir alcohol.

Se ha visto que la búsqueda inducida por recompensas después de un período de abstinencia es igualmente potente tanto para los reforzantes naturales como para las sustancias psicoactivas. Además, se ha visto que varias regiones cerebrales se activan tanto con la búsqueda de opiáceos como de azúcar (74). En términos generales, este patrón de activación apoya un circuito límbico cortico-estriado que conduce el comportamiento de búsqueda de opiáceos. El sistema de la orexina tradicionalmente se ha implicado en la vigilia y la excitación, pero más recientemente se ha demostrado que influyen en la búsqueda de alimentos y drogas (74). Hay hallazgos que apoyan el circuito límbico cortico-estriado que se relaciona con la búsqueda de opiáceos durante la abstinencia y además se han identificado una serie de sustratos neuroanatómicos fuera de este circuito de motivación establecido que podrían contribuir a la búsqueda de recompensas (74). Es importante destacar que hay una considerable superposición con las regiones cerebrales que han estado implicadas en el deseo de drogas en los estudios de imagen humana (74). En consecuencia, estos datos apoyan un modelo de abstinencia-recaída como un modelo preclínico relevante para estudiar la búsqueda de fármacos en ratones.

Se ha destacado el neurocircuito involucrado en la adicción a drogas y en la ingesta de alimentos apetecibles que conduce a la obesidad (75). Las sustancias de abuso tienden a ejercer sus principales efectos directamente sobre las vías de recompensa del cerebro, mientras que los alimentos apetecibles tienden a afectar múltiples vías periféricas y centrales, transmitiendo información a las vías de recompensa del cerebro tanto directa como indirectamente. En el núcleo supraóptico (NSO) hipotalámico y el PVN se produce una marcada disminución del número de neuronas tras una ingesta crónica de alcohol

(que se atribuye a la muerte celular), pero las neuronas que sobreviven sufren un proceso de hipertrofia y aumentan su volumen (se ha visto que el tamaño total de PVN, pero no del NSO, se correlaciona con la ingesta de alcohol) (70).

El BNST es de particular interés, dado que se ha identificado como un locus anatómico donde la señalización de RXFP3 modula la búsqueda de alcohol inducida por el estrés (11), aunque los datos actuales sugieren que la ingesta crónica de alcohol no parece regular marcadamente la expresión de RXFP3 (70). Sin embargo, es posible que los mecanismos de señalización del receptor en sentido descendente, en lugar de la densidad del receptor, puedan verse afectados por el consumo de alcohol; o que la expresión/señalización de RXFP3 sea susceptible de adaptaciones durante el consumo crónico de alcohol.

El alcohol tiene efectos ansiolíticos bien establecidos en humanos y roedores, lo que proporciona apoyo para una hipótesis de "reducción del estrés" con el consumo de alcohol en ciertas circunstancias. Se ha estudiado la exposición repetida al estrés del test de inmovilización seguido por dos sesiones de estrés con el test de la natación forzada (76). La exposición aguda y subcrónica al estrés durante la adicción al alcohol tiene efectos sobre el consumo de alcohol en roedores. La preferencia por el alcohol se reduce significativamente en los ratones KO para RXFP3 hacia el final del período de exposición al estrés, por lo que este efecto podría deberse a una interacción específica de la señalización de RLN3/RXFP3 con el estrés. De esta forma, en ratones, la señalización de RLN3/RXFP3 está implicada en el mantenimiento de una alta preferencia por el alcohol durante y después de las situaciones estresantes, pero no parece regular fuertemente el refuerzo primario del alcohol.

Discusión

El proceso de formación de hábitos de conducta, con la puesta en marcha de los mecanismos que constituyen el sustrato neurobiológico del aprendizaje, es fundamental en todos los tipos de adicción. En las adicciones no químicas, como el juego patológico o las compras compulsivas, en las cuales no existen los efectos dopaminérgicos adicionales

que la sustancia genera, la activación de los mecanismos neurobiológicos propios del aprendizaje motivacional y del aprendizaje de hábitos debe desempeñar un papel fundamental en el control de la conducta adictiva. Además, los efectos profundos de este tipo de aprendizajes, que forman parte de los mecanismos de memoria procedimental, contribuirían a explicar la resistencia a la extinción de las conductas adictiva. La implicación de extensas regiones cerebrales, entre las que destacan el ATV, la amígdala, el estriado ventral y dorsal y la CPF, con cambios neuroadaptativos que incluyen procesos neurobiológicos de aprendizaje y memoria que afectan a estas estructuras (35), puede ser la responsable de la recaída crónica en el consumo y de la dificultad de desarrollo de tratamientos eficaces para el trastorno adictivo. Por otro lado, la interrelación de los procesos que acontecen en el SNC se pone de manifiesto, una vez más, ante la evidencia de cómo la ingesta de drogas se ve condicionada con los ritmos circadianos (44). De esta forma, se puede afirmar que conocemos en gran medida las principales vías neurológicas que definen las conductas adictivas. Esto es importante, dado que se puede empezar a buscar nuevas dianas para tratar la enfermedad adictiva. La HbL ha sido propuesto como un objetivo para tratar la adicción debido a su estrecha relación funcional con el sistema de recompensa (77).

La actividad de theta hipocámpica está fuertemente asociada con la consolidación de la memoria, la excitación, la inhibición del comportamiento, la ansiedad, los estados de sueño, la exploración y el movimiento; actividades que se pueden ver afectadas en personas con enfermedad actividad. La falta de conexiones directas del RPO y otras estructuras moduladoras del TE al septum medial junto con las evidencias previamente expuestas, indicaría pues, que la señalización de RLN3 del NI puede proporcionar un importante centro de retransmisión para las señales iniciadas por el TE, impulsando la actividad theta hipocámpica, jugando posiblemente un papel causal en la disrupción de la actividad theta asociada con enfermedades neuropsiquiátricas (28). Estudios de registro de la actividad de la CPF, del hipocampo y de la amígdala lateral revelan que el patrón de las oscilaciones theta se correlacionan con respuestas de comportamiento individuales durante la adquisición, recuperación y extinción del miedo (78). La sincronización de las oscilaciones theta entre el hipocampo y la amígdala podría depender en parte de una proyección común del NI (22). Los recuerdos aversivos y apetitosos son poderosos condicionantes del comportamiento, pero la expresión inadecuada de la respuesta

condicionada a los estímulos relacionados con el miedo y la droga puede convertirse en trastornos relacionados con la ansiedad y abuso de sustancias respectivamente (79). Estos trastornos se asocian con recuerdos emocionales anormalmente persistentes, que a menudo conducen a la recaída de los síntomas.

Las similitudes entre la bulimia nerviosa y la enfermedad adictiva se basan en que los atracones en los alimentos sabrosos, principalmente los que contienen grandes cantidades de azúcar, junto con la restricción o purga de alimentos, influyen en la neurobiología del SNC de una manera similar que a los efectos que producen las sustancias adictivas. Dicho de otra forma, existen similitudes entre los efectos motivacionales de los alimentos sabrosos y las sustancias psicoactivas (80). En general, las sustancias adictivas tienen efectos más potentes que los alimentos. Sin embargo, las neuroadaptaciones propias de la adicción en el sistema de recompensa contribuyen a la hiperfagia hedónica, lo que probablemente conduzca a la obesidad y otros trastornos crónicos (81).

Los eventos estresantes de la vida están causalmente vinculados con los trastornos de consumo de alcohol, proporcionando apoyo para una hipótesis de que el consumo de alcohol está dirigido a la reducción del estrés. La demostración de que la expresión del ARMm de RLN3 en el cerebro de rata se correlaciona con la ingesta de alcohol y que el antagonismo central de RXFP3 previene la reincidencia inducida por el estrés de la búsqueda de alcohol, implican el papel modulador del estrés del NI en el consumo de sustancias psicoactivas.

Conociendo que el bloqueo de CRF₁ atenúa el consumo de alcohol, los estudios farmacológicos comienzan a desvelar un papel para los receptores de CRF dentro de las vías de recompensa del cerebro. Además, la conclusión de que los diferentes mecanismos de CRF y las vías pueden ser reclutados durante el aumento de la ingesta alcohólica o la ansiedad relacionada con la abstinencia de alcohol (82) da lugar a un camino intrigante para la investigación adicional. Mientras que los efectos del alcohol sobre el eje HPA, la amígdala y otras estructuras relacionadas con el estrés se han caracterizado más ampliamente, comienzan a surgir contribuciones prometedoras de la señalización CRF en las vías de recompensa del cerebro. Podría ser que moléculas

dirigidas a componentes del sistema CRF terminen siendo útiles herramientas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad adictiva.

Conclusión

El sistema NI/RLN3/RXFP3 juega un papel clave en la modulación del estrés, hecho fuertemente relacionado con su expresión de receptores para CRF, y, en consecuencia, modula los procesos que se han desvelado verse afectados ante estas situaciones.

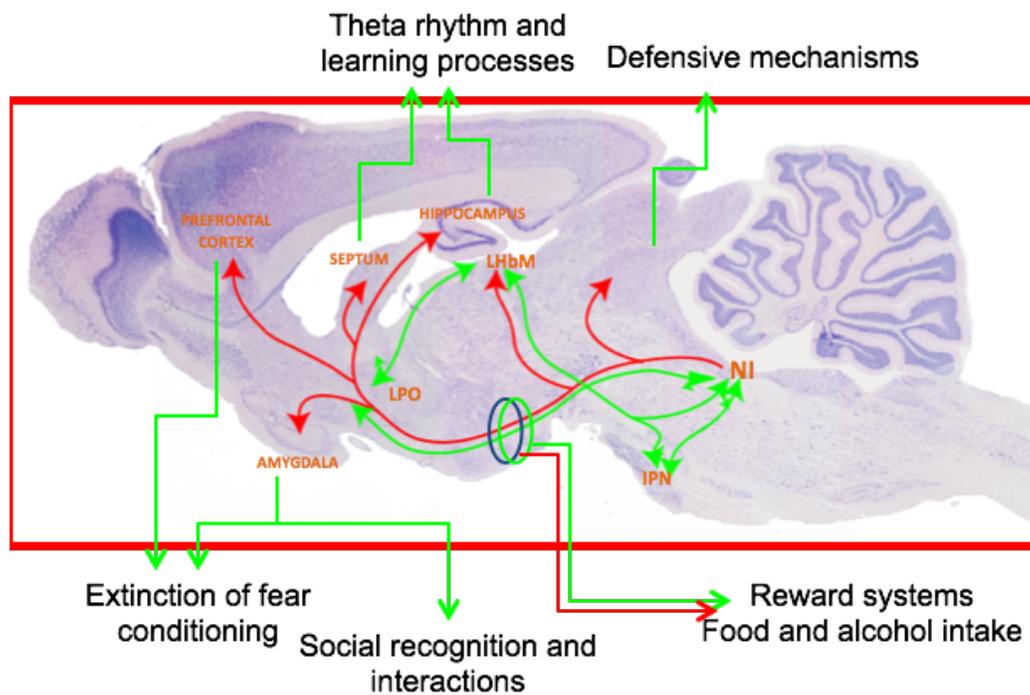


Figura 2. Corte histológico para la representación anatómico-funcional del NI (*Imagen cortesía por Olucha-Bordonau, FE*).

La adicción se presenta, a su vez, como una enfermedad que nace de las vías de recompensa naturales pero en la que altera, por otro lado, la neurobiología regional, degenerando en una serie de procesos que perpetúan la adicción. Otras patologías psiquiátricas, como los trastornos de la alimentación, presentan puntos en común con la adicción y son un buen modelo de estudio comparativo. El sistema NI/RLN3/RXFP3 modula tanto las estructuras implicadas en los procesos de adicción como los de ingesta alimentaria.

La manipulación del sistema NI/RLN3/RXFP3 conduce a la afectación de los mecanismos de recaída al consumo de alcohol y a la alteración de los mecanismos de ingesta alimentaria.

Perspectivas futuras

El sistema NI/RLN3/RXFP3 ha sido descubierto recientemente y su papel en la modulación de los mecanismos de ingesta y adicción puede proporcionar nuevas perspectivas en el tratamiento de las alteraciones de la conducta alimentaria como la obesidad, bulimia, anorexia, así como en los trastornos adictivos. Futuras investigaciones podrían poner de manifiesto también su implicación en otras patologías, principalmente de índole neuropsiquiátrica. Las investigaciones futuras deben fijar el papel concreto de este sistema en esos procesos.

Referencias

1. Grant JE, Odlaug BL, Chamberlain SR. Gambling disorder, DSM-5 criteria and symptom severity. *Compr Psychiatry* [Internet]. 2017 May 21 [cited 2017 Mar 7];75:1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28260605>
2. Fisher HE, Aron A, Brown LL. Romantic love: a mammalian brain system for mate choice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2006 Dec 29 [cited 2017 Mar 7];361(1476):2173–86. Available from: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2006.1938>
3. Pereira T. Neurobiología de la adicción. *Rev Psiquiatr del Uruguay*. 2009;73(1):9–24.
4. Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías (OEDT). Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Informe 2016. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2016.
5. Infante C, Barrio G, Martín E. Tendencias, características y problemas asociados al consumo de drogas recreativas en España. *Adicciones* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2017 Apr 25];15(5):77. Available from: <http://adicciones.es/index.php/adicciones/article/view/454>
6. American Psychiatric Association. Manual diagnóstico y estadístico de los

- trastornos mentales: DSM-5. 5ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2014.
7. Berridge KC, Kringelbach ML. Pleasure systems in the brain. *Neuron* [Internet]. 2015 May 6 [cited 2017 Mar 7];86(3):646–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315001336>
 8. Alavi SS, Ferdosi M, Jannatifard F, Eslami M, Alaghemandan H, Setare M. Behavioral Addiction versus Substance Addiction: Correspondence of Psychiatric and Psychological Views. *Int J Prev Med* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Mar 6];3(4):290–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624087>
 9. Zorumski CF, Mennerick S, Izumi Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2017 Mar 6];48(1):1–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741832913002103>
 10. Koob GF. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. *Curr Top Behav Neurosci* [Internet]. 2013 [cited 2017 Mar 6];13:3–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744309>
 11. Ryan PJ, Kastman HE, Krstew E V, Rosengren KJ, Hossain MA, Churilov L, et al. Relaxin-3/RXFP3 system regulates alcohol-seeking. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(51):20789–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297931> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 12. Liu C, Chen J, Sutton S, Roland B, Kuei C, Farmer N, et al. Identification of Relaxin-3/INSL7 as a Ligand for GPCR142. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Dec 12 [cited 2017 Mar 8];278(50):50765–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522967>
 13. Smith CM, Ryan PJ, Hosken IT, Ma S, Gundlach AL. Relaxin-3 systems in the brain--the first 10 years. *J Chem Neuroanat* [Internet]. 2011 Dec [cited 2017 Mar 8];42(4):262–75. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891061811000500>
 14. Smith CM, Lawrence AJ, Sutton SW, Gundlach AL. Behavioral phenotyping of mixed background (129S5:B6) relaxin-3 knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1160:236–41.

15. Gundlach AL, Smith CM, Ryan PJ, Blasiak A, Olucha-bordonau FE, Ma S. (2013). Relaxins. *Handbook of Biologically Active Peptides*, (2), pp.907-916.
16. Ma S, Sang Q, Lanciego JL, Gundlach AL. Localization of relaxin-3 in brain of *Macaca fascicularis*: Identification of a nucleus incertus in primate. *J Comp Neurol*. 2009;517(6):856–72.
17. Silvertown JD, Neschadim A, Liu HN, Shannon P, Walia JS, Kao JCH, et al. Relaxin-3 and receptors in the human and rhesus brain and reproductive tissues. *Regul Pept* [Internet]. 2010;159(1–3):44–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2009.09.007>
18. Tanaka M, Iijima N, Miyamoto Y, Fukusumi S, Itoh Y, Ozawa H, et al. Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2005 Mar [cited 2017 Mar 7];21(6):1659–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2005.03980.x>
19. Olucha-Bordonau FE, Otero-García M, Sánchez-Pérez AM, Núñez Á, Ma S, Gundlach AL. Distribution and targets of the relaxin-3 innervation of the septal area in the rat. *J Comp Neurol* [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2017 Mar 6];520(9):1903–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134882>
20. Goto M, Swanson LW, Canteras NS. Connections of the nucleus incertus. *J Comp Neurol* [Internet]. 2001 Sep 10 [cited 2017 Mar 7];438(1):86–122. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.1303>
21. Olucha-Bordonau FE, Teruel V, Barcia-González J, Ruiz-Torner A, Valverde-Navarro AA, Martínez-Soriano F. Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *J Comp Neurol*. 2003;464(1):62–97.
22. Ryan PJ, Ma S, Olucha-Bordonau FE, Gundlach AL. Nucleus incertus-An emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(6):1326–41.
23. Kania A, Gugula A, Grabowiecka A, de Ávila C, Blasiak T, Rajfur Z, et al. Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3-RXFP3 signalling. *J Physiol* [Internet]. 2017 Feb 18 [cited 2017 Mar 2]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098344>
24. Miyamoto Y, Watanabe Y, Tanaka M. Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regul Pept*. 2008;145(1–3):54–9.

25. Greco MA, Shiromani PJ. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res Mol Brain Res* [Internet]. 2001 Mar 31 [cited 2017 Mar 8];88(1–2):176–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295245>
26. Bathgate RAD, Samuel CS, Burazin TCD, Layfield S, Claasz AA, Reytomas IGT, et al. Human Relaxin Gene 3 (H3) and the Equivalent Mouse Relaxin (M3) Gene: Novel Members of the Relaxin Peptide Family. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jan 11 [cited 2017 Mar 7];277(2):1148–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689565>
27. You W. Role of the Nucleus Incertus in Cognition. 2014 [cited 2017 Mar 8]; Available from: <http://www.scholarbank.nus.edu.sg/handle/10635/113314>
28. Kumar JR, Rajkumar R, Jayakody T, Marwari S, Hong JM, Ma S, et al. Relaxin' the brain: a case for targeting the nucleus incertus network and relaxin-3/RXFP3 system in neuropsychiatric disorders. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Sep 6 [cited 2017 Mar 8]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27597467>
29. Ma S, Smith CM, Blasiak A, Gundlach AL. Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Oct 23 [cited 2017 Mar 8]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27774604>
30. García Pardo MP, Roger Sánchez C, De la Rubia Ortí JE, Aguilar Calpe MA. Modelos animales de adicción a las drogas. *Adicciones* [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2017 Mar 6];0(0):862. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28170057>
31. Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Lluch J, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. Social experiences affect reinstatement of cocaine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2009 Dec 2 [cited 2017 Mar 7];207(3):485–98. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-009-1678-1>
32. Piccoli L, Micioni Di Bonaventura MV, Cifani C, Costantini VJA, Massagrande M, Montanari D, et al. Role of Orexin-1 Receptor Mechanisms on Compulsive Food Consumption in a Model of Binge Eating in Female Rats. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2012 Aug 9 [cited 2017 Mar 7];37(9):1999–2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569505>
33. Calvez J, de Ávila C, Matte L-O, Guèvremont G, Gundlach AL, Timofeeva E. Role of

- relaxin-3/RXFP3 system in stress-induced binge-like eating in female rats. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 Mar 2];102:207–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607097>
34. Lenglos C, Mitra A, Guèvremont G, Timofeeva E. Regulation of expression of relaxin-3 and its receptor RXFP3 in the brain of diet-induced obese rats. *Neuropeptides* [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 Mar 2];48(3):119–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629399>
 35. Corominas Roso M, Roncero C, Bruguera E, Casas M. Sistema dopaminérgico y adicciones. *Rev Neurol*. 2007;44(1):23–31.
 36. Pedrero, E. (2011). *Neurociencia y adicción*. 1ª ed. [Valencia]: Sociedad Española de Toxicomanías.
 37. Settell ML, Testini P, Cho S, Lee JH, Blaha CD, Jo HJ, et al. Functional Circuitry Effect of Ventral Tegmental Area Deep Brain Stimulation: Imaging and Neurochemical Evidence of Mesocortical and Mesolimbic Pathway Modulation. *Front Neurosci* [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 21];11:104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316564>
 38. Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2004 Jul [cited 2017 Mar 21];28(4):415–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289006>
 39. Fletcher PJ, Tenn CC, Rizos Z, Lovic V, Kapur S. Sensitization to amphetamine, but not PCP, impairs attentional set shifting: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2005 Dec 12 [cited 2017 Mar 6];183(2):190–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16220338>
 40. Everitt BJ, Wolf ME. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2017 Mar 6];22(9):3312–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978805>
 41. Ito R, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ. Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci* [Internet]. 2002 Jul 15 [cited 2017 Mar 6];22(14):6247–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12122083>
 42. Matsumoto M, Hikosaka O. Lateral habenula as a source of negative reward signals

- in dopamine neurons. *Nature* [Internet]. 2007 Jun 28 [cited 2017 Mar 21];447(7148):1111–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522629>
43. Loonen AJM, Ivanova SA. Circuits Regulating Pleasure and Happiness: The Evolution of the Amygdalar-Hippocampal-Habenular Connectivity in Vertebrates. *Front Neurosci* [Internet]. 2016 Nov 22 [cited 2017 Mar 20];10:539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920666>
 44. Salaberry NL, Mendoza J. Insights into the Role of the Habenular Circadian Clock in Addiction. *Front Psychiatry* [Internet]. 2016 Jan 5 [cited 2017 Mar 20];6:179. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779042>
 45. Baker PM, Jhou T, Li B, Matsumoto M, Mizumori SJY, Stephenson-Jones M, et al. The Lateral Habenula Circuitry: Reward Processing and Cognitive Control. *J Neurosci* [Internet]. 2016 Nov 9 [cited 2017 Mar 21];36(45):11482–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911751>
 46. Loonen AJM, Ivanova SA. Commentary on “A non-reward attractor theory of depression”: A proposal to include the habenula connection. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2017 Feb 21 [cited 2017 Mar 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28232092>
 47. Loonen AJM, Ivanova SA. Circuits Regulating Pleasure and Happiness—Mechanisms of Depression. *Front Hum Neurosci* [Internet]. 2016 Nov 10 [cited 2017 Mar 20];10:571. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27891086>
 48. Zhao H, Rusak B. Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience* [Internet]. 2005 Jan [cited 2017 Mar 21];132(2):519–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802202>
 49. Guilding C, Hughes ATL, Piggins HD. Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2017 Mar 21];169(4):1630–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547209>
 50. Ellison G, Irwin S, Keys A, Noguchi K, Sulur G. The neurotoxic effects of continuous cocaine and amphetamine in Habenula: implications for the substrates of psychosis. *NIDA Res Monogr* [Internet]. 1996 [cited 2017 Mar 21];163:117–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809856>
 51. Ma S, Gundlach AL. Ascending control of arousal and motivation: role of nucleus

- incertus and its peptide neuromodulators in behavioural responses to stress. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2015 Jun [cited 2017 Mar 21];27(6):457–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12259>
52. Bittencourt JC, Sawchenko PE. Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *J Neurosci* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2017 Apr 26];20(3):1142–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648719>
 53. Rajkumar R, Wu Y, Farooq U, Tan WH, Dawe GS. Stress activates the nucleus incertus and modulates plasticity in the hippocampo-medial prefrontal cortical pathway. *Brain Res Bull* [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Mar 21];120:83–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923015300496>
 54. Callander GE, Ma S, Ganella DE, Wimmer VC, Gundlach AL, Thomas WG, et al. Silencing relaxin-3 in nucleus incertus of adult rodents: A viral vector-based approach to investigate neuropeptide function. *PLoS One*. 2012;7(8).
 55. Santos FN, Pereira CW, Sánchez-Pérez AM, Otero-García M, Ma S, Gundlach AL, et al. Comparative Distribution of Relaxin-3 Inputs and Calcium-Binding Protein-Positive Neurons in Rat Amygdala. *Front Neuroanat* [Internet]. 2016;10(April):36. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnana.2016.00036/abstract>
 56. Kumar JR, Rajkumar R, Lee LC, Dawe GS. Nucleus incertus contributes to an anxiogenic effect of buspirone in rats: Involvement of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016;110:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.019>
 57. Nuñez A, Cervera-Ferri A, Olucha-Bordonau F, Ruiz-Torner A, Teruel V. Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2006 May [cited 2017 Mar 14];23(10):2731–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16817876>
 58. Martínez-Bellver S, Cervera-Ferri A, Luque-García A, Martínez-Ricós J, Valverde-Navarro A, Bataller M, et al. Causal relationships among neurons of the nucleus incertus and the hippocampal theta activity in the rat. *J Physiol* [Internet]. 2016;0:1–18. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP272841/abstract;jsessionid=FB00FC5251B238BFE804753FA7189FA7.f04t01%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1113/JP272841>

59. Ma S, Blasiak A, Olucha-Bordonau FE, Verberne AJM, Gundlach AL. Heterogeneous responses of nucleus incertus neurons to corticotrophin-releasing factor and coherent activity with hippocampal theta rhythm in the rat. *J Physiol* [Internet]. 2013;591(16):3981–4001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671163>
60. Justice NJ, Yuan ZF, Sawchenko PE, Vale W. Type 1 corticotropin-releasing factor receptor expression reported in BAC transgenic mice: implications for reconciling ligand-receptor mismatch in the central corticotropin-releasing factor system. *J Comp Neurol* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2017 Mar 14];511(4):479–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.21848>
61. Banerjee A, Shen P-J, Ma S, Bathgate RAD, Gundlach AL. Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology* [Internet]. 2010 Jan [cited 2017 Mar 7];58(1):145–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560474>
62. Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* [Internet]. 2002 Jan 31 [cited 2017 Mar 14];33(3):325–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832222>
63. Buzsáki G. Theta rhythm of navigation: Link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus* [Internet]. 2005 [cited 2017 Mar 14];15(7):827–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149082>
64. Teruel-Martí V, Cervera-Ferri A, Nuñez A, Valverde-Navarro AA, Olucha-Bordonau FE, Ruiz-Torner A. Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. *Brain Res* [Internet]. 2008 Jul 7 [cited 2017 Mar 14];1218:87–96. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899308008810>
65. Cervera-Ferri A, Guerrero-Martínez J, Bataller-Mompeán M, Taberner-Cortés A, Martínez-Ricós J, Ruiz-Torner A, et al. Theta synchronization between the hippocampus and the nucleus incertus in urethane-anesthetized rats. *Exp Brain Res* [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2017 Mar 14];211(2):177–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00221-011-2666-3>
66. Sánchez-Pérez AM, Arnal-Vicente I, Santos FN, Pereira CW, EIMlili N, Sanjuan J, et al. Septal projections to nucleus incertus in the rat: bidirectional pathways for modulation of hippocampal function. *J Comp Neurol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited

- 2017 Mar 21];523(4):565–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.23687>
67. Lenglos C, Mitra A, Guèvremont G, Timofeeva E. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes, Brain Behav* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Mar 2];12(4):370–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23425370>
 68. Calvez J, de Ávila C, Timofeeva E. Sex-specific effects of relaxin-3 on food intake and body weight gain. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2017 Mar 2]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27245781>
 69. Hadad NA, Knackstedt LA. Addicted to palatable foods: comparing the neurobiology of Bulimia Nervosa to that of drug addiction. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2014 May 6 [cited 2017 Mar 21];231(9):1897–912. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-014-3461-1>
 70. Ryan PJ, Krstew E V., Sarwar M, Gundlach AL, Lawrence AJ. Relaxin-3 mRNA levels in nucleus incertus correlate with alcohol and sucrose intake in rats. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. 2014;140(June):8–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.04.017>
 71. Heilig M, Koob GF. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Mar 21];30(8):399–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629579>
 72. Quadros IMH, Macedo GC, Domingues LP, Favoretto CA. An update on CRF mechanisms underlying alcohol use disorders and dependence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7(OCT).
 73. Hwa LS, DeBold JF, Miczek KA. Alcohol in excess: CRF1 receptors in the rat and mouse VTA and DRN. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2013 Jan 11 [cited 2017 Mar 21];225(2):313–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885872>
 74. Madsen HB, Brown RM, Short JL, Lawrence AJ. Investigation of the neuroanatomical substrates of reward seeking following protracted abstinence in mice. *J Physiol* [Internet]. 2012;590(10):2427–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3424762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 75. Longo DL, Volkow ND, Koob GF, McLellan AT. Neurobiologic Advances from the

- Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Jan 28 [cited 2017 Mar 7];374(4):363–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816013>
76. Walker AW, Smith CM, Chua BE, Krstew E V., Zhang C, Gundlach AL, et al. Relaxin-3 receptor (RXFP3) signalling mediates stress-related alcohol preference in mice. *PLoS One*. 2015;10(4):1–17.
 77. Pierce RC, Vassoler FM. Deep brain stimulation for the treatment of addiction: basic and clinical studies and potential mechanisms of action. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2013 Oct 2 [cited 2017 Mar 21];229(3):487–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23907650>
 78. Lesting J, Daldrup T, Narayanan V, Himpe C, Seidenbecher T, Pape H-C. Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. Dickson CT, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 24 [cited 2017 Mar 14];8(10):e77707. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0077707>
 79. Lee JLC, Bertoglio LJ, Guimarães FS, Stevenson CW. Cannabidiol regulation of emotion and emotional memory processing: relevance for treating anxiety-related and substance abuse disorders. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2017 Mar 7 [cited 2017 Mar 14]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28268256>
 80. Rogers PJ. Food and drug addictions: Similarities and differences. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2017 Feb [cited 2017 Mar 6];153:182–90. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305717300035>
 81. Wiss DA, Criscitelli K, Gold M, Avena N. Preclinical evidence for the addiction potential of highly palatable foods: Current developments related to maternal influence. *Appetite* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2017 Mar 7]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989563>
 82. Knapp DJ, Overstreet DH, Huang M, Wills TA, Whitman BA, Angel RA, et al. Effects of a stressor and corticotrophin releasing factor on ethanol deprivation-induced ethanol intake and anxiety-like behavior in alcohol-preferring P rats. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2011 Nov 4 [cited 2017 Mar 21];218(1):179–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21643675>