

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Psicología

Departamento de Psicobiología

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PSICOBIOLOGÍA DE LAS
DROGODEPENDENCIAS



**Implicación del sistema glutamatérgico y del
GHB en la adicción a la morfina y a la cocaína.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Concepción Maldonado Adrián

Dirigida por:

Dr. José Miñarro López

Dra. Marta Rodríguez Arias

Valencia, Junio de 2006



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

El Doctor D. José Miñarro López y la Doctora Dña. Marta Rodríguez Arias, Profesores Titulares de Psicobiología de la Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universitat de València

Certifican,

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Concepción Maldonado Adrián, con el título "Implicación del Sistema glutamatérgico y del GHB en la Adicción a la Morfina y a la Cocaína", ha sido realizada bajo su dirección. Tras haberla examinado hacen constar su autorización para que se realicen los trámites conducentes a su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado a uno de Junio de 2006.

Fdo: Dr. José Miñarro López

Fdo: Dra. Marta Rodríguez Arias

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes Becas y Ayudas:

- Ministerio de Educación y Ciencia. Dirección General de Investigación y FEDER (Referencias: BS02002-00106 y SEJ2005-00316).
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de Salud “Carlos III” (FIS). Redes Temáticas de Investigación Cooperativa. Red de Trastornos Adictivos (G03/005) y Proyectos de Investigación (PI052165).
- Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat, Dirección General de Drogodependencias.

Concepción Maldonado Adrián está disfrutando de una Beca de FPI del Ministerio de Educación y Ciencia (Ref: BES-2003-2953)

RESUMEN

Concepción Maldonado Adrián. Implicación del sistema glutamatérgico y del GHB en la adicción a la morfina y a la cocaína. Tesis Doctoral. Unidad de Investigación “Psicobiología de las Drogodependencias”. Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universitat de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez, 21. 46010 Valencia. España.

El Objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue el de estudiar la participación de la neurotransmisión glutamatérgica y del GHB en la adicción a los opiáceos y a la cocaína.

En primer lugar hemos pretendido observar la contribución de estos dos sistemas de neurotransmisión en los efectos que la morfina presenta sobre las conductas sociales. Nuestra hipótesis fue que la afectación del sistema glutamatérgico, concretamente bloqueando los receptores NMDA (utilizando Memantina y MK-801) así como la facilitación de la neurotransmisión GABAérgica, mediante la administración de GHB (ácido gamma-hidroxibutírico) podrían modificar los efectos que sobre las conductas sociales ejerce la morfina. Igualmente nos planteamos estudiar si tanto los síntomas físicos como los motivacionales, medidos mediante el Condicionamiento Aversivo de Lugar (CAL), observados en el síndrome de abstinencia a la morfina, podían verse modificados por las acciones anteriormente mencionadas sobre el sistema glutamatérgico o GABAérgico.

También hemos observado el papel del de estos dos sistemas de neurotransmisión sobre las acciones reforzantes de la cocaína. Hemos estudiado el papel sistema glutamatérgico y del GHB sobre los efectos

reforzantes de la cocaína, la adquisición, la expresión y el restablecimiento (recaída) mediante el condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL) inducido por esta droga. Mediante esta serie de estudios tratamos de explorar el papel de estos sistemas de neurotransmisión tanto en los efectos reforzantes, como en la recaída en el consumo de cocaína.

Los resultados indicaron que la administración de memantina produce un aumento en la actividad motora no afectando a la acción antiagresiva de la morfina. La memantina bloquea los síntomas físicos y motivacionales del síndrome de abstinencia a la morfina mientras que el MK-801 fue más eficaz en bloquear únicamente los síntomas motivacionales de este síndrome de abstinencia evaluados mediante el CAL. Por otra parte pudimos observar como el GHB potencia las conductas sociales inducidas por la morfina contrarrestando paralelamente la hiperactividad inducida por este opiáceo, mejorando tanto los aspectos físicos como motivacionales del síndrome de abstinencia a la morfina. Además hemos observado como el GHB no potencia los efectos reforzantes de la cocaína, evaluados mediante el CPL, bloqueando la reinstauración de la búsqueda de cocaína (recaída) cuando se administra durante la adquisición o la expresión del condicionamiento o junto con una dosis “priming” de cocaína. Además hemos observado como el bloqueo de los receptores NMDA y AMPA mediante la administración de la memantina y el CNQX previene la adquisición y expresión de CPL inducido mediante cocaína, no siendo capaces de bloquear la recaída inducida por administraciones “priming” de esta misma droga.

Este trabajo nos indica que la neurotransmisión glutamatérgica interviene de una manera crucial en el establecimiento de la dependencia a la morfina, como se observa por la reducción de los signos físicos y motivacionales en la abstinencia a la morfina tras la administración de agentes que bloquean los receptores NMDA. Nuestros resultados también

nos indican una clara interacción entre el sistema opiáceo y el GABAérgico, ya que GHB (metabolito del GABA) interactúa con la morfina, potenciando los comportamientos sociales inducidos por la morfina pero a su vez contrarrestando la actividad motora inducida por el opiáceo. Hemos confirmado que el GHB es una herramienta útil para aliviar el síndrome de abstinencia físico a los opiáceos, y lo que consideramos aún de mayor importancia, también los aspectos motivacionales de la misma. Asimismo hemos podido comprobar como el GHB afecta a los comportamientos de búsqueda de la cocaína bloqueando la recaída. Por último, el sistema glutamatérgico también juega un papel en la adquisición y expresión del CPL inducido mediante cocaína, pero por el contrario no parece intervenir de forma fundamental en la reinstauración de esta preferencia mediante dosis “priming” de la droga.

Nuestros resultados nos pueden ayudar a comprender mejor los fenómenos neurobiológicos que subyacen en la conducta adictiva a las drogas y plantean la posible utilización de la Memantina y del GHB en el tratamiento de la adicción, sugiriendo su importancia como herramientas terapéuticas en la adicción a los opiáceos y a los psicoestimulantes (cocaína).

Palabras clave: morfina, cocaína, NMDA, AMPA, CNQX, Memantina, MK-801, GHB, Naloxona, Síndrome de Abstinencia físico y motivacional, Condicionamiento Aversivo de Lugar (CAL), Condicionamiento de la Preferencia de Lugar (CPL), conducta agresiva, actividad motora, recaída, interacción social, ratones.

ABSTRACT

Concepción Maldonado Adrián. Involvement of the glutamatergic system and GHB in morphine and cocaine addiction. Doctoral Thesis. Unit of Research "Psicobiología de las Drogodependencias". Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Universitat de Valencia, Avda. Blasco Ibáñez, 21, 46010 Valencia, Spain.

The main aim of the present Doctoral Thesis was to study the participation of the glutamatergic neurotransmission and GHB in the addiction to opiates and cocaine.

Firstly, we observed the contribution of these two systems of neurotransmission to the effects that morphine presents on social behaviours. Our hypothesis was that the impairment of the glutamatergic system by blocking the NMDA receptors (using Memantine and MK-801) as well as the facilitation of the GABAergic neurotransmission, by GHB administration (gamma-hydroxybutyric acid) could modify the effects that morphine exerts on social behaviours. Likewise, we studied whether the physical as well as the motivational symptoms, measured by means of Conditioned Place Aversion (CPA), observed in the morphine withdrawal syndrome, could be modified by the previously mentioned actions on the glutamatergic or GABAergic systems.

We have also studied the role of these two neurotransmission systems in the rewarding actions of cocaine. We examined the influence of the glutamatergic system and GHB on the acquisition, expression and reinstatement (relapse) of the cocaine-induced conditioned place preference (CPP). With these studies we explored the role of these neurotransmission systems in the cocaine-rewarding effects and the relapse to cocaine

Abstract

consumption.

Our results show that memantine administration significantly increased motor activity without modifying the antiaggressive effect of morphine. Memantine blocked the physical and motivational symptoms of the morphine withdrawal, whereas MK-801 was more effective in blocking only the motivational symptoms of this withdrawal syndrome evaluated by the CPA procedure. On the other hand, we could observe that GHB potentiates morphine-induced effects on social behaviours, counteracting the hyperactivity induced by this opiate, and ameliorating the physical as well as motivational aspects of the morphine withdrawal syndrome. In addition, we have observed that GHB has no synergic action on the rewarding effects of cocaine, evaluated by the CPP procedure, It blocked the cocaine-seeking behaviour (relapse) when it was administered during the acquisition or the expression of the conditioning or with a “priming” dose of cocaine. Also we have observed that NMDA and AMPA receptors blockaded by memantine and CNQX administration prevented the acquisition and expression of cocaine-induced CPP but did not show the ability to block the relapse induced by “priming” administration of this same drug.

The present study indicates that glutamatergic neurotransmission plays an important role in the establishment of morphine dependency, as is observed by the reduction of the physical and motivational signs in the morphine withdrawal after the administration of NMDA receptor blockers. Our results also indicate a clear interaction between the opiate and GABAergic systems, since GHB (a GABA metabolite) interacts with morphine, having an additive effect on morphine-affected social behaviours but counteracting morphine-induced increases in motor activity. We have confirmed that GHB is a useful tool capable of ameliorating both the physical as well as motivational aspects of opiate withdrawal. Also we verified that the relapse in cocaine-seeking behaviour could be blocked by GHB when

administered during the acquisition of the conditioning procedure, the expression, or even, jointly with a priming dose of cocaine. Finally, the glutamatergic system also plays a role in the acquisition and expression of the cocaine-induced CPP, but not so in the reinstatement of this preference by a priming dose of cocaine.

Our results can help to better understand the underlying neurobiological phenomena in the drugs addictive behaviour and the possible use of memantine and GHB in the treatment of addiction, suggesting their importance as therapeutic tools in the addiction to opiates and psychoestimulants (cocaine).

Keywords: Morphine, Cocaine, NMDA, AMPA, CNQX, Memantine, MK-801, GHB, Naloxone, Physical and motivational withdrawal syndrome, Conditioned Place Aversion (CPA), Conditioned Place Preference (CPP), Aggressive behaviour, Motor activity, Relapse, Social interaction, Mice.

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral está basada en los siguientes seis estudios:

1. M. Rodríguez-Arias, C. Maldonado, M.A. Aguilar y J. Miñarro (2002). Memantine does not block antiaggressive effects of morphine in mice. *Behavioural Pharmacology* 13: 249-252.
2. C. Maldonado, O.Cauli, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar y J. Miñarro (2003). Memantine presents different effects from MK-801 in motivational and physical signs of morphine withdrawal. *Behavioural Brain Research* 144: 25-35.
3. Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, Ana Castillo, María A. Aguilar, José Miñarro (2006). NMDA and AMPA receptor antagonists block acquisition, expression but not reinstatement of cocaine-induced CPP in mice. Submitted to *Eur. Neuropsychopharmacol.*
4. C. Maldonado, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro (2003). GHB differentially affects morphine actions on motor activity and social behaviours in male mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 76: 259-265.
5. Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, María A. Aguilar, José Miñarro (2004). GHB ameliorates naloxone-induced conditioned place aversion and physical aspects of morphine withdrawal in mice. *Psychopharmacology*, 177: 130-140.

6. Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, Ana Castillo, María A. Aguilar, José Miñarro (2006). Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behavioural Pharmacology* 17:119–131.

Para mis hijos Talos y Zoe

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	19
2. OPIÁCEOS	27
2.1. Neurobiología de los efectos reforzantes de los opiáceos	32
2.2. Síndrome de abstinencia físico y motivacional	35
2.3. Adicción a los opiáceos y sistema glutamatérgico	39
2.4. Opiáceos y Conducta agresiva	41
3. COCAÍNA	45
3.1. Cocaína y Condicionamiento de preferencia de lugar	49
3.2. Reinstauración del CPL por inyecciones priming	52
4. EL ÁCIDO GAMMA-HIDROXI-BUTIRICO (GHB)	55
4.1. Papel del GHB en la adicción a los opiáceos	60
4.2. Papel del GHB en los efectos reforzantes de la cocaína	63
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
6. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS.	71
Estudio 1.	73
Estudio 2.	83
Estudio 3.	107
Estudio 4.	151
Estudio 5.	169
Estudio 6.	195

7. DISCUSIÓN GENERAL

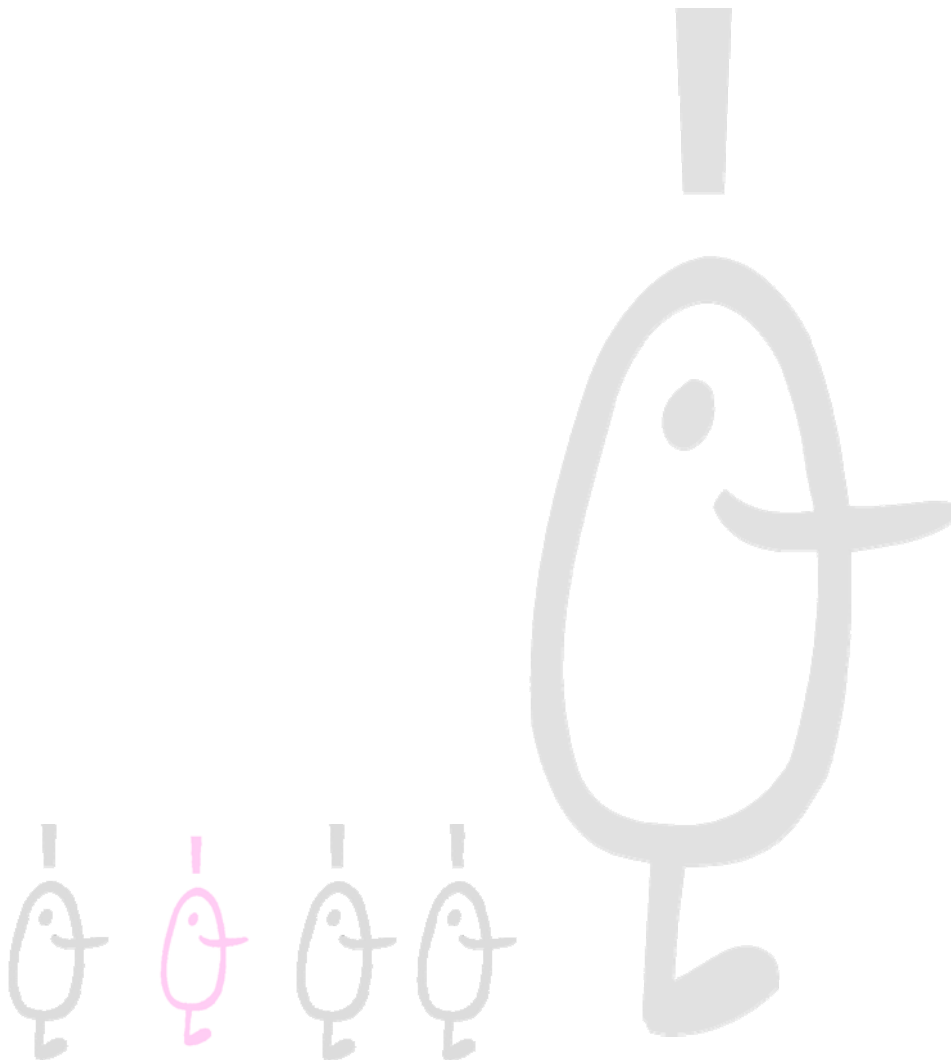
225

8. CONCLUSIONES

237

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

247





1. Introducción



1. INTRODUCCIÓN

Cuando se estudia la adicción a las sustancias de abuso desde un punto de vista neurobiológico, la dopamina aparece como uno de los neurotransmisores más fuertemente implicados. Nuestro grupo de investigación lleva años desarrollando una serie de estudios en los cuales hemos tratado de aportar un poco luz sobre el papel que la dopamina ejerce en diferentes aspectos de la adicción, fundamentalmente a la morfina. Hemos demostrado como los diferentes receptores dopaminérgicos se encuentran implicados en una serie de acciones como son los efectos reforzantes, la conducta de búsqueda de la droga, la sensibilización a los efectos de la misma, las acciones antiagresivas, los efectos motores o el síndrome de abstinencia tras el cese de la administración de morfina. Todos estos estudios nos han confirmado que la dopamina es uno de los neurotransmisores más involucrados en los efectos de la morfina. Pero también nos han hecho ver que no debe ser el único, posiblemente puede que ni siquiera el más importante. Esta ha sido la razón fundamental que nos ha llevado a plantearnos el estudio de otros sistemas de neurotransmisión.

Uno de los enfoques más actuales e interesantes de la adicción es contemplar este proceso como una forma de aprendizaje. La toma repetida de la droga induce en el sujeto una serie de cambios neurobiológicos que le hacen “aprender” a tomar y a buscar esta sustancia. Numerosas investigaciones han demostrado que el consumo de sustancias de abuso induce cambios cerebrales similares a los producidos por la experiencia. De esta forma, las drogas de abuso usurpan los mecanismos normales de aprendizaje para establecer sus propias “memorias”. La neurotransmisión glutamatérgica es crítica para el establecimiento de cambios estables en las sinapsis que permiten la consolidación de un aprendizaje, así como el

mantenimiento de esta información. Por lo tanto, nuestro grupo de investigación se planteó un ambicioso estudio en el cual se evaluara el papel de los receptores de glutamato, fundamentalmente los NMDA, en diferentes acciones, no sólo de la morfina sino también de otros grupo diferente de drogas de abuso, los psicoestimulantes, mediante el empleo de la cocaína. La utilización de ambas drogas nos permitiría, al comparar los datos obtenidos, un conocimiento más genérico sobre el papel del glutamato en la adicción a las drogas de abuso. Adicionalmente nos permitiría observar las diferencias específicas en los mecanismos implicados en ambas drogas.

Cuando se estudia el sistema glutamatérgico, sistema de neurotransmisión excitatorio por excelencia del SNC, inmediatamente nos viene a la cabeza su opuesto, el sistema GABAérgico, sistema de inhibición por excelencia. Desde hace unos años comenzamos a tener conocimiento de la utilización de un compuesto, inicialmente utilizado como anestésico, el GHB, como nueva sustancia de abuso en los ambientes *rave* junto a las conocidas como drogas de “diseño”. El GHB se consume casi siempre asociado al alcohol, el MDMA, la cocaína o incluso la heroína. Desde hacía tiempo se venía informando de la utilización, con bastante éxito, de esta sustancia como tratamiento en la dependencia al alcohol y a los opiáceos, en una serie de estudios clínicos realizados fundamentalmente en Italia. El GHB es un ácido graso de cadena corta que se encuentra de forma natural en el cerebro, formando parte del metabolismo del GABA. Aunque presenta receptores propios, actúa también sobre los receptores GABA_B de forma inespecífica. Todas estas características nos animaron a utilizar este compuesto como herramienta para estudiar el papel que la estimulación del sistema GABAérgico podría tener sobre las acciones de la morfina y de la cocaína. De esta forma, estudiando tanto el sistema excitatorio glutamatérgico y el inhibitorio GABAérgico sobre dos drogas de abuso que presentan características propias, la morfina y la cocaína, esperábamos

poder obtener resultados que nos informaran de la naturaleza común de la conducta adictiva.

El estudio de un solo aspecto de la adicción, aunque puede ofrecernos una información muy interesante, siempre será parcial. Por este motivo decidimos estudiar un amplio rango de conductas desde la actividad motora, pasando por las acciones sobre la conducta agresiva, la dependencia evaluada mediante el síndrome de abstinencia tanto físico como motivacional, hasta los efectos reforzantes y la conducta de búsqueda de la droga, con el fin de obtener un amplio panorama de las acciones conductuales de la morfina y la cocaína.

En el primer estudio pretendimos observar si el bloqueo de los receptores NMDA modifica el efecto que la estimulación del sistema opiáceo produce sobre la conducta agresiva inducida por aislamiento. Para ello, evaluamos la acción de diferentes dosis del antagonista NMDA, memantina (sola o junto con una dosis de morfina), sobre la conducta social y agresiva en ratones macho. Los resultados obtenidos nos indican que la administración de memantina no afectó a la acción antiagresiva de la morfina, siendo por lo tanto improbable que el sistema glutamatérgico participe en este efecto.

La exposición crónica a los opiáceos produce cambios tanto comportamentales como neurales (tolerancia y dependencia física) representando estos fenómenos cambios adaptativos del sistema nervioso ante la exposición crónica a los opiáceos y relacionándose con el fenómeno de la plasticidad neural. Entre los receptores del glutamato, los NMDA juegan un papel importante en la potenciación a largo plazo, y por tanto podrían estar implicados en la plasticidad neural relacionada con los opiáceos. En el segundo estudio analizamos el síndrome de abstinencia físico y motivacional (mediante la aversión al lugar asociado con la

abstinencia) que se produce cuando se bloquean bruscamente (tras administrar naloxona) los receptores opiáceos en ratones dependientes de la morfina. Nuestro objetivo fue observar el efecto que sobre ambos aspectos del síndrome de abstinencia presentaban diferentes antagonistas de los receptores NMDA, (la memantina y el MK-801). En conjunto, nuestra hipótesis de partida era que dichos fármacos disminuirían los síntomas de abstinencia, tanto físicos como motivacionales. Nuestros resultados sugieren que los receptores NMDA, están implicados en ambos aspectos de la abstinencia a la morfina, ya que son necesarios para el establecimiento tanto del condicionamiento aversivo de lugar (CAL) como para la expresión del síndrome físico, sugiriendo que el receptor de NMDA es necesario para el establecimiento de la dependencia a la morfina.

Aunque el papel de la neurotransmisión glutamatérgica en las acciones de la cocaína ha sido ampliamente demostrado, los resultados referidos a los efectos de diversos antagonistas de los receptores del glutamato sobre las acciones reforzantes de la cocaína siguen siendo confusos. El propósito del tercer estudio fue evaluar el papel de los receptores NMDA y AMPA sobre dichos efectos utilizando para ello el condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL). Empleamos el antagonista del receptor NMDA memantina y el antagonista del receptor AMPA, CNQX que se administraron junto con cocaína durante la fase de adquisición o expresión del procedimiento, siendo ambas sustancias capaces de suprimir la preferencia en ambas fases del procedimiento. Adicionalmente, en animales en los cuales el CPL fue establecido con cocaína, una vez que la preferencia se extinguió, se indujo el restablecimiento mediante una dosis no contingente de este psicoestimulante. Ninguno de los antagonistas del glutamato fue capaz de bloquear el restablecimiento de esta preferencia. Nuestros resultados confirman que la adquisición y la expresión de la asociación entre un ambiente distintivo y los efectos de la cocaína dependen de los receptores

NMDA y AMPA, pero por el contrario, el restablecimiento inducido por dosis “priming” de cocaína parece ser independiente de estos receptores.

En el cuarto estudio, tratamos de ampliar el conocimiento sobre las acciones sociales y motoras que ejerce la morfina, estudiando las acciones que el GHB ejercería sobre ellas. Inicialmente se evaluó el efecto de varias dosis de GHB sobre la actividad motora espontánea y la hiperactividad inducida por la morfina. En general se asume que la estimulación motora y los efectos de recompensa de las sustancias de abuso se encuentran relacionados. Así, un incremento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducido por la administración de una droga sería el responsable tanto de sus efectos motores como reforzantes. Por otra parte, aunque el GHB se ha utilizado para mejorar los síntomas de abstinencia en los adictos al alcohol o a la heroína (situaciones que implican un incremento de la irritabilidad o la agresividad), no se ha llegado a evaluar completamente la acción específica de este compuesto sobre la conducta agresiva. Nuestros resultados apoyan la idea de que existe una relación entre los sistemas GHBérgico y opiáceo, sugiriendo que esta interacción dependerá del comportamiento evaluado. Aunque el GHB contrarresta de modo eficaz la hiperactividad inducida por la morfina, potenciando su acción antiagresiva.

Como hemos mencionado previamente, numerosas investigaciones sugieren que el GHB puede interferir con los sistemas cerebrales responsables de la expresión de las propiedades reforzantes de las sustancias de abuso y en los cambios neuroadaptativos que ocurren en el proceso de la dependencia. Se ha demostrado que el GHB mejora los síntomas físicos de la abstinencia en heroinómanos, aunque no se han estudiado sus efectos sobre los aspectos motivacionales de dicha abstinencia. Con el propósito de clarificar mejor la acción del GHB sobre la abstinencia a la morfina en el quinto estudio hemos estudiado ambos

aspectos del síndrome de abstinencia, empleando la misma metodología que en el segundo estudio. Nuestros resultados indican que el GHB es capaz de mejorar tanto los aspectos físicos como motivacionales de la abstinencia a este opiáceo.

La cocaína y el GHB comparten acciones neurofisiológicas comunes en las neuronas dopaminérgicas, aumentando la liberación de DA, especialmente en la región ventromedial del núcleo accumbens. Así, el GHB y la cocaína comparten la capacidad de estimular la neurotransmisión dopaminérgica aumentando la concentración extracelular estriatal de DA. Ya que ambas drogas actúan de una manera similar sobre la neurotransmisión DA, cabría esperar un efecto aditivo. El objetivo principal del sexto estudio fue evaluar el efecto de la administración de GHB sobre las acciones reforzantes de la cocaína. Pero nuestro objetivo fue doble puesto que, ya que el GHB ha demostrado ser eficaz como herramienta terapéutica para mejorar el deseo y la abstinencia al alcohol y a los opiáceos, sugerimos que esta sustancia podría disminuir la reinstauración de la búsqueda de cocaína. Nuestros resultados indican que el GHB afecta a las acciones reforzantes de la cocaína dependiendo del proceso estudiado. Cuando se administra durante la fase de adquisición, es capaz de bloquear la preferencia, pero solamente con dosis puntuales. Por otra parte, no se aprecian efectos evidentes cuando se administra durante la fase de expresión. Finalmente, el GHB solo con una dosis intermedia consiguió bloquear la recaída inducida por la cocaína. En conclusión, el GHB puede alterar los efectos reforzantes de la cocaína y el comportamiento de búsqueda de la misma, debiendo tenerse este hecho en consideración a la hora de tratar a consumidores de cocaína.



2. Opiáceos



2. OPIÁCEOS

Los opiáceos son conocidos desde hace mucho tiempo como sustancias naturales, que se encuentran en el jugo de las semillas de la adormidera o *papaver somniferum*. Este jugo seco y fermentado se denomina opio y contiene una mezcla de alcaloides opiáceos. En 1806, el químico alemán Friedrich Sertürner consiguió aislar el principal elemento del opio en su forma pura al que denominó morfina. Posteriormente, y tras mínimas alteraciones químicas, se pudieron obtener opiáceos semi-sintéticos. Desde hace 50 años, es posible obtener sustancias completamente sintéticas, casi sin relación química con la morfina, pero induciendo efectos similares.

Los opiáceos son sustancias cuyo origen se encuentra en el opio, es decir, son sustancias que se extraen de la cápsula de la planta del opio. Por extensión, se denominan también así los productos químicos derivados de la morfina. El término opioide, sin embargo, se utiliza para designar aquellas sustancias endógenas o exógenas que tiene un efecto análogo al de la morfina y poseen actividad intrínseca (Seidenberg y Honegger., 2000)

La adicción a los opiáceos produce elevados costes tanto humanos como sociales, siendo las drogas con mayor poder adictivo. La historia natural de la adicción a los opiáceos es la de un desorden que se mantiene de forma estable en el tiempo, donde se alternan ciclos de remisión y recaída del uso, prolongándose estos patrones durante largos períodos de tiempo. La exposición a los opiáceos induce cambios duraderos en el cerebro (Nestler., 2004), lo que apoya la idea de que la adicción debe considerarse como un desorden crónico a lo largo de la vida (Ribeiro do Couto y cols., 2005).

En la intoxicación producida tras una inyección intravenosa de opiáceos se han descrito cuatro diferentes componentes, que pueden solaparse en el tiempo. En el primero, se experimenta una profunda euforia que ocurre aproximadamente a los 10 segundos de la inyección e incluye una onda de sensaciones eufóricas, caracterizada con frecuencia en términos sexuales. En este primer estado, también hay sensaciones viscerales, rubor facial, y cambios de la voz. Mientras que otros efectos demuestran tolerancia con el uso crónico, esta primera “fase” de euforia es bastante resistente a la tolerancia. En segundo lugar, se experimenta una sensación general de bienestar que puede durar varias horas. A diferencia de la anterior, en esta fase sí que se desarrolla tolerancia. La tercera fase, es un estado de escape de la realidad que puede extenderse desde la somnolencia a la inconsciencia. Los adictos lo describen como calma y distanciamiento, mostrándose completamente desinteresados por los acontecimientos externos a su propio estado. La cuarta fase es el estado donde el usuario ya no experimenta ninguno de los efectos de las fases anteriores, pero tampoco padece la abstinencia (Koob y Le Moal., 2006).

La exposición crónica a los opiáceos induce cambios conductuales y neurales conocidos como tolerancia y dependencia física (Nestler, 1996). La tolerancia se puede definir como la respuesta disminuida a una droga con la administración repetida, o la necesidad de utilizar dosis más grandes para obtener el mismo efecto. Se desarrolla tolerancia a los efectos analgésicos, eufóricos, sedativos, y a otros efectos depresores del sistema nervioso central causado por el uso de opiáceos. Los adictos a opiáceos pueden aumentar la administración hasta alcanzar dosis enormes, como 2 g de morfina intravenosa a intervalos de 2-3 horas, sin que ello suponga cambios significativos en la presión arterial o el ritmo cardíaco. La dosis mortal de morfina en un sujeto no tolerante es de aproximadamente 30 mg si se administra parenteralmente o de 120 mg si se injiere por vía oral. En animales de laboratorio también se ha observado un rápido desarrollo de

tolerancia a los diversos efectos de los opiáceos. Se ha constatado la aparición de tolerancia a los efectos analgésicos, reforzantes o antiagresivos de los opiáceos tras la administración continua (Shippenberg y Elmer., 1998; Rodríguez-Arias y cols., 2001; Bailey y Connor., 2005).

Tras la interrupción del consumo, los adictos a opiáceos experimentan una abstinencia caracterizada por un estado de disforia y ansiedad acompañada de molestias periféricas que caracterizan la dependencia psíquica y física a los opiáceos. Los síntomas incluyen bostezos, lagrimeo, transpiración, escalofríos, temblores, pupilas dilatadas, anorexia, náuseas, diarrea, insomnio, pérdida de peso, deshidratación, elevaciones de la temperatura y de la presión arterial y alteraciones del pulso. Mientras que muchos de estos síntomas son reconocidos como manifestaciones de alteraciones en la función del sistema nervioso autónomo, también se observa un estado afectivo negativo que acompaña estos síntomas físicos de la abstinencia a los opiáceos. El estado afectivo negativo se puede definir como un estado disfórico, acompañado por síntomas depresivos y de ansiedad, que no cumplen completamente los criterios para un desorden mental mayor, tal como un episodio depresivo importante o un desorden generalizado de ansiedad. Es por ello que los adictos intentan obtener la droga suficiente para “prevenir la disforia asociada al síndrome de abstinencia a los opiáceos” (Koob y Le Moal., 2006).

En estudios realizados en animales de laboratorio, la abstinencia aguda a la morfina se utiliza con el fin de estudiar las manifestaciones físicas de la dependencia, apareciendo cuando se interrumpe la administración de la droga o tras la administración de un antagonista opiáceo, como la naloxona (Broseta y cols., 2002) La intensidad de los signos físicos y vegetativos específicos que caracterizan la fase de la abstinencia a la morfina refleja el grado de dependencia.

2.1 Neurobiología de los efectos reforzantes de los opiáceos.

Los opiáceos, tal como la heroína y la morfina, son fácilmente autoadministrados de forma intravenosa por ratones, ratas, y monos. Si se provee acceso limitado, las ratas mantienen niveles estables diarios de toma de la droga sin desarrollar ninguna muestra importante de dependencia física (Koob, 1987). Se ha observado que la disminución de la dosis de heroína disponible para el animal cambia el patrón de autoadministración, produciéndose disminuciones del intervalo entre inyecciones, y el correspondiente aumento en el número de administraciones (Koob, 1987). Resultados similares se obtienen administrando antagonistas opiáceos competitivos, tanto de forma sistémica como central, sugiriendo que los animales intentan compensar este antagonismo incrementando la cantidad de droga inyectada (Goldberg y cols., 1971; Weeks y Collins, 1976; Ettenberg y cols, 1982; Koob y cols, 1984; Vaccarino y cols, 1985b).

Numerosos estudios han sugerido que el área tegmental ventral y el núcleo accumbens son los sustratos neurales responsables de las características reforzantes de los opiáceos y que existen mecanismos de acción de los opiáceos dependientes e independientes de la dopamina (Stinus y cols., 1989; Spyraki y cols., 1983; Shippenberg y cols., 1992; van Ree y cols., 1999). El antagonista opiáceo methylnaloxonium, inyectado en el ventrículo lateral, en el área tegmental ventral y en el núcleo accumbens, incrementa la autoadministración de heroína (disminuyendo el intervalo entre inyecciones), siendo el núcleo accumbens la estructura más sensible a este efecto (Vaccarino y cols., 1985a, b). Estos resultados sugieren que los receptores opiáceos en el área tegmental ventral y el núcleo accumbens juegan un papel importante en las acciones reforzantes de los opiáceos. Estudios de condicionamiento de lugar también corroboran el importante

papel del área tegmental ventral en los efectos reforzantes de los opiáceos en ratas no dependientes (Bals-Kubik y cols., 1993).

Sin embargo, los sustratos neurales postsinápticos del núcleo accumbens no parecen ser tan importantes para la aparición de los efectos reforzantes de los opiáceos. El bloqueo del receptor dopaminérgico o la denervación DA del núcleo accumbens (utilizando la neurotoxina 6-hidroxidopamina), suprime la autoadministración de cocaína y de anfetamina (Roberts y cols., 1977, 1980; Lyness y cols., 1979), pero no afecta la autoadministración de heroína o de morfina (Ettenberg y cols., 1982; Smith y cols., 1985; Dworkin y cols., 1988b). Efectos similares, independientes de la DA, han sido observados en estudios farmacológicos de autoadministración de heroína utilizando antagonistas DA (Ettenberg y cols., 1982; Gerrits y cols., 1994; Hemby y cols., 1996). Aunque la administración sistémica de antagonistas DA atenúa la autoadministración de opiáceos, muchos de estos efectos se han observado sólo a dosis que afectan la conducta motora o la tasa de respuesta (van Ree y cols., 1999).

Así, parece los opiáceos pueden ejercer algunas de sus acciones reforzantes a través de la acción sobre otros sistemas neurotransmisores. Es por ello importante estudiar la intervención de dichos sistemas sobre las diversas acciones tanto conductuales como neurológicas de los opiáceos.

Los agonistas del receptor opiáceo μ aumentan la liberación DA en regiones terminales inhibiendo las neuronas GABAérgicas en el VTA. En condiciones normales, estas neuronas proporcionan una inhibición tónica a las neuronas DA, y al inhibirse el resultado es el aumento en la liberación DA (Shalev y cols., 2002).

Sin embargo, parece ser que la vía dopaminérgica no es la única implicada en el refuerzo provocado por los opiáceos y la cocaína. En el caso de los opiáceos, el área tegmental ventral y el núcleo accumbens reciben

proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal y áreas límbicas. Las neuronas corticales glutamatérgicas y las neuronas tegmentales dopaminérgicas parecen tener funciones integradoras ya que ambas hacen sinapsis con espinas dendríticas de neuronas GABAérgicas en el núcleo accumbens. Estudios bioquímicos han demostrado la regulación de liberación de dopamina por el glutamato y por sus receptores NMDA. Por otra parte, varios estudios indican que el sistema glutamatérgico presentaría una hiperactividad durante la abstinencia a los opiáceos. (Hong y cols., 1993; Rasmussen., 1991; Satoh y cols., 1976; Sepúlveda y cols., 1998). La tolerancia y dependencia física a los opiáceos representan cambios adaptativos del sistema nervioso ante la exposición crónica a los opiáceos y se relacionan con el fenómeno de la plasticidad neural (Mao., 1999). Entre los receptores del glutamato, los NMDA juegan un papel importante en la potenciación a largo plazo, y por tanto estarían implicados en la plasticidad neural relacionada con los opiáceos. La activación de los receptores NMDA parece ser necesaria para la expresión de diferentes efectos comportamentales y fisiológicos de los opiáceos, puesto que el bloqueo de estos receptores inhiben el desarrollo de tolerancia y dependencia física a la morfina (Trujillo y Akil., 1991; Trujillo., 2000). También se ha observado que previenen el condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL) inducido por morfina en ratones y ratas (del Pozo y cols., 1996; Kim y cols., 1996; Popik y Danysz., 1997; Tzschentke y Schmidt., 1997) la expresión del comportamiento agresivo en ratones dependientes a morfina (Sukhotina y Beshpalov., 2000) y la adquisición de la autoadministración intravenosa de morfina en ratones (Semenova y cols., 1999).

2.2 Síndrome de abstinencia físico y motivacional

La administración crónica de morfina induce al desarrollo gradual de dependencia, tanto física como psicológica. El síndrome de abstinencia se caracteriza por alteraciones físicas y motivacionales que son la expresión de la dependencia a la droga. Para inducir la dependencia a la morfina en animales de laboratorio se utilizan diferentes programas, prácticamente cada laboratorio utiliza su programa particular de inducción, ya sea mediante la implantación de pellets o las inyecciones repetidas de morfina. La precipitación del síndrome de abstinencia, una vez establecida la dependencia a un agonista opiáceo, se puede producir interrumpiendo la administración de dicha sustancia (abstinencia espontánea) o administrando un antagonista opiáceo, como la naloxona (abstinencia inducida). Igualmente, se utiliza una gran variedad de análisis etológicos de los signos físicos para evaluar la intensidad de la dependencia establecida. Cada grupo de investigación cuenta con su propio procedimiento individualizado que diferirá según la especie animal a evaluar y las categorías conductuales analizadas. En ratones, los “saltos” (jumping) son uno de los signos más frecuentemente utilizados para evaluar el grado de dependencia a la morfina. En el procedimiento empleado en nuestro laboratorio, tras inducir la dependencia a la morfina mediante la inyección diaria de dosis crecientes de este agonista opiáceo, se administra a los animales una dosis de naloxona, habitualmente de 1 mg/kg de peso, e inmediatamente se sitúa a los ratones en una caja experimental. Desde ese momento, se procede a grabar la conducta de los animales en vídeo para su ulterior análisis, mediante un programa de ordenador (por ejemplo Ratón time) que permite la valoración del tiempo dedicado por los animales a cada categoría de conducta. Algunas de las conductas útiles para evaluar el grado de intensidad de los signos físicos de la abstinencia a la morfina en ratones se pueden resumir en las siguientes categorías:

- 1 Aseo corporal: el ratón se lame o rasca las patas o el pelo y se limpia con las patas delanteras.
- 2 Temblor de patas: el animal mueve las patas delanteras con movimientos laterales rápidos.
- 3 Temblor de cuerpo (“wet dog shakes”): el cuerpo del animal tiembla con sacudidas espontáneas.
- 4 Saltos (“jumping”): el animal salta de la superficie de la pecera (las cuatro patas en el aire).



Fig. 1



Fig. 2

- 5 Exploración: el animal se mueve por la superficie de la pecera para explorarla o se apoya en las paredes de la misma con las dos patas delanteras.
- 6 Postura bípeda o erguido sobre las patas traseras (“Rearing”): postura erguida de exploración. El animal se eleva de la superficie por lo menos en un ángulo de 30 grados sin apoyar las patas delanteras en las paredes de la caja experimental. (Fig. 1)
- 7 Aseo genital: el animal lame sus genitales. (Fig. 2)
- 8 Inmovilidad: el ratón está acostado o tumbado quieto sobre la

superficie de la caja experimental.

- 9 Locomoción circular: el ratón camina en círculos por los extremos de la caja experimental sin pasar por el centro de la misma.
- 10 Ptosis: cierre de los párpados con lagrimeo espeso. (Figs. 1 y 3)



Fig. 3



Fig. 4

- 11 Micción: el animal orina en la caja experimental.
- 12 Piloerección: erección del pelo. (Fig.4)
- 13 Diarrea: presencia de heces blandas.

Entre todas ellas, algunas son específicas de la abstinencia a la morfina, como el temblor de cuerpo, de patas o los saltos. Adicionalmente al estudio de los cambios conductuales, se puede evaluar globalmente la intensidad del síndrome de abstinencia a la morfina utilizando una escala que otorgue una puntuación única. En ratas, la escala más ampliamente utilizada es la de Gellert y Holtzman (Gellert y Holtzman, 1978), que fue posteriormente modificada en nuestro laboratorio para su utilización en ratones (Broseta y cols., 2002). La escala modificada contempla dos clases de signos, cuantitativos y cualitativos. Se consideran signos cuantitativos: el

porcentaje de pérdida de peso corporal, y el número de saltos y de temblores de cuerpo. Entre los signos cualitativos, en los cuales sólo se evalúa su presencia o ausencia, se considera: la diarrea, la ptosis, la postura anormal y la erección o eyaculación.

El modelo animal utilizado con más frecuencia para evaluar los aspectos motivacionales de la abstinencia a la morfina es el condicionamiento aversivo de lugar (CAL) inducido por naloxona. Este paradigma ha demostrado ser un índice altamente sensitivo de las consecuencias motivacionales derivadas de la abstinencia en animales crónicamente dependientes a los opiáceos (Azar y cols., 2003). Por ejemplo, se puede conseguir un CAL con dosis de hasta 0,004 mg/kg de naloxona en ratas crónicamente dependientes a la morfina (Schulteis et al. 1994). Este modelo emplea un condicionamiento Pavloviano clásico, ya que los animales evitan los estímulos ambientales asociados previamente con reforzadores negativos tales como naloxona (aversión de lugar). En este paradigma, los animales (ratas y ratones) son entrenados inicialmente a asociar determinadas claves contextuales, presentes en uno de los compartimentos de las cajas de condicionamiento, con una inyección de naloxona y su correspondiente efecto aversivo. Otras claves contextuales distintas, presentes en el otro compartimento de las cajas de condicionamiento, serán asociadas con una inyección de suero fisiológico. Después de esta fase de condicionamiento, cuando se da a los animales la posibilidad de elección entre los dos ambientes, estos pasan más tiempo en el compartimento o ambiente asociado con el suero fisiológico, considerándose este hecho una medida del grado de aversión inducida por la naloxona.

El escaso resultado de los tratamientos farmacológicos utilizados para tratar el abuso a los opiáceos podría deberse, al menos en parte, al hecho de que estos tratamientos, tales como administración de la clonidina,

mejoran principalmente los aspectos físicos del síndrome de abstinencia. Por lo tanto, las manipulaciones farmacológicas que disminuyan los aspectos motivacionales de la abstinencia a los opiáceos podrían ser tratamientos muy beneficiosos de la dependencia a estas sustancias de abuso.

2.3 Adicción a los opiáceos y sistema glutamatérgico

Las vías dopaminérgicas, particularmente las del sistema mesolímbico, se han asociado tanto con los aspectos motivacionales como físicos del abuso a las sustancias adictivas. En relación a los signos físicos de abstinencia a la morfina, estudios recientes indican la importancia de la neurotransmisión DA, ya que la administración de SCH 23390 y de raclopride (antagonistas dopaminérgicos D1 y D2, respectivamente) disminuye la expresión de estos signos de abstinencia en ratones (Diaz y cols., 2005). Sin embargo, hasta la fecha, las terapias que apuntan a la neurotransmisión dopaminérgica, como la utilización de los antagonistas de la dopamina, no han demostrado ser tratamientos eficaces ni seguros en la adicción a los opiáceos (Pulvirenti y Koob, 1994; Popik y Danysz, 1997).

Además del sistema dopaminérgico, el sistema glutamatérgico también parece estar implicado en la abstinencia a los opiáceos, Durante la abstinencia a la morfina se produce un gran incremento en los niveles de glutamato y aspartato en el locus coeruleus (LC) (Feng y cols., 1995). Esto contribuye a la abstinencia activando las neuronas del LC y por tanto, favorece la expresión del síndrome de abstinencia física (Kogan y Aghajanian., 1995). La administración de antagonistas NMDA, como el MK-801 o la memantina, junto con morfina impide el desarrollo tanto de tolerancia como de dependencia, disminuyendo la intensidad del síndrome de abstinencia físico (Popik y Skolnick, 1996; Mao, 1999). En un estudio reciente de Popik y colaboradores (2003) se observó que la memantina inhibía la intensidad de la abstinencia a la morfina y la adquisición y

expresión del condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la morfina. Diferentes investigaciones apuntan la implicación de los receptos NMDA en los fenómenos relacionados con la drogadicción. En estudios preclínicos, los antagonistas del receptor NMDA disminuyen la tolerancia a los efectos locomotores y sedativos del alcohol (Khanna y cols.1993, File y Fernández, 1994), atenúan la sensibilización a los psicoestimulantes (Pudlak y Bozarth, 1993; Wolf y Khansa, 1991; Popik y Danisz., 1997) y modifican los cambios adaptativos causados por el tratamiento de nicotina (Shoib y Stolerman, 1992; Popik Danisz, 1997). Igualmente, los antagonistas del receptor NMDA afectan a los procesos de tolerancia y dependencia a opiáceos. Se ha comprobado que los antagonistas del receptor NMDA disminuyen la tolerancia a los efectos analgésicos de los opiáceos (Ben-Eliyahu y cols., 1992; Bhargava y Matwyshyn, 1993; Elliott y cols., 1994. Popik y Danisz, 1997). Así mismo, diversas investigaciones demuestran que disminuyen tanto los signos físicos como los aspectos motivacionales de la abstinencia a la morfina (Cappendijk y cols., 1993; Higgins y cols., 1992; Popik y Danisz., 1997).

Estos resultados sugieren que la función del receptor de NMDA sería necesaria para el establecimiento de la dependencia a la morfina, ya que los antagonistas de este receptor reducen o incluso anulan los signos físicos y motivacionales de la abstinencia.

2.4 Opiáceos y Conducta agresiva

Estudios realizados en seres humanos parecen sugerir que el consumo de opiáceos incrementa la agresividad (Berman y cols.1993). En estudios realizados en el laboratorio, utilizando el paradigma de *Point Subtraction Aggression* indican que las puntuaciones son perceptiblemente más altas en individuos abstinentes o adictos a la heroína en tratamiento con metadona que en sujetos control. Estos resultados sugieren que los pacientes dependientes de la heroína exteriorizan más su agresividad que los sujetos sanos (Gerra y cols., 2001; Gerra y cols., 2004).

En animales de laboratorio, la administración de opiáceos induce una compleja serie de efectos conductuales, presentando un efecto dual sobre el comportamiento agresivo según se estudie tras una administración única o tras una continuada. Numerosos estudios realizados en varias especies animales, demuestran que la administración aguda de morfina suprime la agresión inducida por diversos procedimientos (Poshivalov y Khodkko., 1984; Kinsley y Bridges., 1986; Haney y Miczek., 1989, 1994). Este efecto generalmente se alcanza con dosis no debilitantes, lo que sugiere una acción específica antiagresiva de los opiáceos. En una serie de estudios realizados en nuestro laboratorio, observamos que la administración aguda de morfina producía efectos antiagresivos en ratones macho, utilizando el paradigma de agresión inducida por aislamiento. También se constató un incremento en el tiempo que los ratones dedicaban a la exploración no social, representando la hiperactividad motora que induce este agonista opiáceo (Rodríguez-Arias et al., 1997). Estos efectos desaparecieron tras un tratamiento crónico de 7 días, sugiriéndonos el desarrollo de tolerancia a los efectos antiagresivos y motores de la morfina (Rodríguez-Arias y cols., 2001). Sin embargo, tras un tratamiento crónico cuando se suspende la administración de morfina o se administra naloxona, es decir cuando los animales se encuentran en una abstinencia espontánea

o inducida, se observa un incremento en las conductas agresivas (Rodríguez-Arias y cols., 1999) (Figs 5 y 6).



Fig 5



Fig 6

La agresión durante la abstinencia a la morfina fue demostrada en primer lugar en ratas por Boshka y colaboradores (1966), quienes observaron que cuando las ratas dependientes dejaban de recibir la morfina, comenzaban a luchar espontáneamente. La severidad de la agresión observada en la abstinencia depende del momento en que esta es evaluada, y de la cantidad de droga recibida. El pico máximo de agresión aparece a las 72 h de la última inyección de morfina, aunque la agresión es ya significativamente evidente a las 48 h (Kantak y Miczek, 1986).

La administración del antagonista opiáceo naloxona produce un síndrome de abstinencia inmediato en los animales dependientes, volviéndose estos muy irritables y difíciles de manejar (Gianutsos y cols., 1975b). En un estudio realizado por Rodríguez-Arias y colaboradores (1999), tras la inducción de una débil dependencia a morfina en ratones (2 mg/kg diarios durante 14 días), la inyección de naloxona precipitó un incremento del tiempo que los animales pasaban amenazando o atacando a sus coespecíficos.

Diversos estudios apuntan a que la manipulación farmacológica de la neurotransmisión dopaminérgica puede alterar los componentes agresivos de la abstinencia a la morfina. Los agonistas catecolaminérgicos como la anfetamina, la cocaína o la clonidina, aumentan la agresión valorada mediante el paradigma de intruso-residente (Kantak y Miczek, 1988; Lal y cols., 1971; Tidey y Miczek, 1992a), siendo esta contrarrestada tras la administración de antagonistas dopaminérgicos (Tidey y Miczek, 1992b; Rodríguez-Arias y cols., 1999).

Otros sistemas neurotransmisores, como el glutamatérgico, parecen también estar implicados en la elevada agresividad observada en animales abstinentes a opiáceos. Los antagonistas del receptor NMDA, la memantina y el MRZ 2/579, reducen la expresión de este comportamiento de forma específica, sin producir efectos significativos sobre los contactos sociales no agresivos (Sukhotina y Bespalov, 2000). Este efecto podría ser debido a una acción específica sobre los procesos desencadenados por la abstinencia a la morfina.



3. Cocaína

3. COCAÍNA

Los psicoestimulantes son sustancias que producen una gran activación conductual, normalmente acompañada por un incremento en los niveles de alerta y de actividad motora. El individuo responde con más facilidad o prontitud a los estímulos tanto exógenos como endógenos. Las sustancias estimulantes psicomotoras se pueden dividir en dos grandes grupos: simpáticomiméticas (directas o indirectas) y no simpáticomiméticas. Originalmente el término *sympathin* se utilizó para describir a la hormona noradrenalina. Así, las drogas simpáticomiméticas imitan las acciones periféricas de la norepinefrina en el sistema autónomo, y neurofarmacológicamente, activan directa o indirectamente los receptores de las monoaminas. La cocaína y la Anfetamina son drogas simpáticomiméticas indirectas, es decir, imitan esta acción actuando sobre mecanismos neuronales que no suponen la activación directa de los receptores postsinápticos.

La cocaína es un alcaloide que se encuentra en cantidades importantes en las hojas de un arbusto, *Erithroxylum Coca*, originario de los Andes y que se cultiva en América del Sur. Estas hojas fueron utilizadas hace ya 5000 años por los incas peruanos que las mascaban para aumentar su resistencia al frío, al hambre y a la fatiga originada por el trabajo. Las hojas de coca se mastican mezcladas con cal, ya que esta mezcla permite una absorción lenta y progresiva de la cocaína, incrementando los efectos beneficiosos del alcaloide. Este principio activo en un primer momento produce un efecto anestésico en la misma lengua impidiendo que la persona note el sabor amargo de la droga. Posteriormente, actúa sobre la mucosa del estómago anulando la sensación de hambre, y cuando el jugo es absorbido y pasa a la sangre y desde allí al cerebro, produce una estimulación que provoca en el individuo un bienestar general y una

ausencia de cansancio físico. La cocaína es un psicoestimulante motor que, además de incrementar el estado de alerta, produce una estimulación conductual con un potente componente motor. Cuando la cocaína se administra de forma crónica produce cambios prolongados en el comportamiento, sensibilización conductual y también adicción.

La cocaína es uno de los mayores reforzadores naturales que existen hoy en día, y por tanto, la adicción que produce es muy potente acarreado trastornos en el comportamiento en un plazo relativamente corto. El patrón de abuso de la cocaína sigue una trayectoria circular. Primero, aparece un estado de euforia intenso, potenciado por la rápida velocidad de acceso al cerebro (por ejemplo tras la administración intravenosa o fumada), seguido por una inmediata disforia (Van Dyke y Byck., 1982). El comienzo y la intensidad del estado eufórico y la subsiguiente disforia dependen de la ruta de administración, siendo la cocaína fumada la que produce el estado eufórico más rápido e intenso, así como el inicio más rápido del malestar. Con el uso crónico, la dosis requerida para producir euforia aumenta, y el bienestar subjetivo disminuye.

El principal problema clínico en los adictos tanto a los opiáceos como a cocaína, es la alta tasa de reincidencia y el fuerte deseo de consumir la droga, aún después de muchos años de abstinencia. El *craving* o ansia por la droga es un sentimiento subjetivo de los adictos, siendo el primer paso para reiniciar la búsqueda y, consecuentemente, reincidir en el consumo abusivo de la droga. Estudios de laboratorio realizados en seres humanos han demostrado que la exposición a la droga incrementa la conducta y el deseo de consumir la misma. En modelos animales, la exposición a la droga, tras la extinción de la respuesta reforzada por la misma, incrementa la tasa de respuesta. Muchos estudios han demostrado que la administración de “primings” de morfina o cocaína produce el restablecimiento de la autoadministración, tras haber sido inducida su

extinción (Shalev y cols., 2002; Chiamulera y cols., 1996; Shaham y cols., 1997a; Le y cols., 1998)

Es importante pues, evaluar mediante diferentes técnicas de laboratorio, los efectos que estas sustancias adictivas ejercen sobre diferentes conductas, para posteriormente estudiar los mecanismos neurobiológicos subyacentes, de tal manera que nuestros resultados puedan ayudar a desarrollar farmacoterapias útiles en el tratamiento de la adicción a estas sustancias.

3.1 Cocaína y Condicionamiento de preferencia de lugar (CPL)

Los comportamientos implicados en el abuso de las sustancias adictivas son altamente sensibles a ser controlados por el medio ambiente. Ciertas situaciones ambientales son capaces de provocar, por su sola presencia, una necesidad imperiosa de droga (craving) que va a ocasionar la recaída del sujeto, incluso si lleva abstinentemente varias semanas o meses. Se trata de situaciones contextuales que en el pasado han sido asociadas a los efectos agradables de la droga o por el contrario a los efectos aversivos del síndrome de abstinencia.

Las claves ambientales previamente asociadas con la toma de la droga pueden más tarde elicitar en los sujetos abstinentes el deseo intenso y la recaída al consumo de la sustancia. Entre los diversos enfoques utilizados para evaluar los efectos reforzantes de las drogas en modelos animales, encontramos el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL). Esta técnica permite evaluar la intensidad del recuerdo, del valor hedónico, que una sustancia inyectada produce en el animal. Este modelo es uno de los más interesantes puesto que se centra en los aspectos apetitivos de la conducta más que en los aspectos consumatorios, como por el contrario ocurre con el paradigma de la autoadministración de drogas. En estas experiencias, el animal (rata o ratón) es emplazado en una

jaula con varios compartimentos que puede distinguir por el color de las paredes, la textura del revestimiento del suelo y por diferentes olores (figs.7 y 8) En este procedimiento un estímulo particular, o ambiente, se aparea con los efectos de la droga, sin que el animal tenga que aprender a realizar una respuesta para obtener la droga, y un segundo ambiente se aparea explícitamente con la ausencia de la droga. En el ensayo de test, al animal se le permite moverse libremente entre el área apareada previamente con la droga y el ambiente no relacionado con la misma. Si el animal permanece más tiempo en presencia de los estímulos asociados previamente con la droga, se puede decir que estos estímulos han adquirido características incentivas secundarias o condicionadas por medio de la asociación de éstos con los efectos de recompensa de la droga. Este protocolo experimental permite además testar a un animal mucho tiempo después de la fase de condicionamiento. De esta manera un animal volverá de forma preferencial al compartimento donde recibió una droga, varios meses después de su administración, revelando así la intensidad de los efectos y del recuerdo dejado por la droga (Koob 1995).

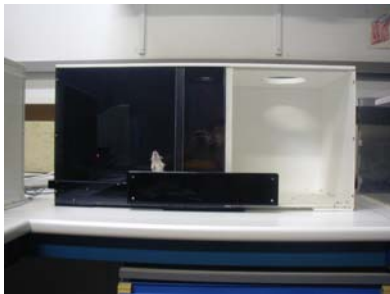


Fig. 7



Fig. 8

La cocaína produce sus efectos apetitivos debido a un aumento en la transmisión dopaminérgica de las neuronas mesocorticolímbicas, consideradas como el substrato neural del refuerzo. Esta sustancia aumenta la liberación de DA en las regiones terminales de las neuronas dopaminérgicas, especialmente en la región ventromedial del núcleo accumbens. La cocaína estimula la neurotransmisión dopaminérgica aumentando la concentración extracelular estriatal de DA, lo que la convierte en una droga capaz de producir una fuerte adicción. Diversos estudios han demostrado la capacidad de la cocaína para inducir CPL (Harris y Aston-Jones., 2003; Kazuto y cols., 2005), además, una vez establecida la preferencia se mantiene a lo largo del tiempo (más de cuatro semanas) cuando los animales realizan pruebas (test) de CPL ocasionales (Mueller y cols., 2000). Por ejemplo, en un estudio reciente se observó que la administración de 10 mg/kg de cocaína en el área tegmental ventral (ATV) en ratas induce CPL (Harris y Aston-Jones., 2003).

El papel que la neurotransmisión glutamatérgica juega en los efectos conductuales y reforzantes de la cocaína se hace cada día más patente, a pesar de que la cocaína no ejerce una acción directa sobre los receptores glutamatérgicos. La administración crónica o aguda de cocaína en ratas, incrementa los niveles extracelulares de glutamato en diversas áreas cerebrales, especialmente en el sistema límbico. En concreto, la transmisión glutamatérgica en el núcleo accumbens parece jugar un importante papel en la recaída de la autoadministración de cocaína en ratas. Numerosas investigaciones han confirmado el papel que juega el sistema glutamatérgico en las acciones de la cocaína, así por ejemplo, la administración sistémica de antagonistas glutamatérgicos bloquean la sensibilización motora (Wolf y Jeziorski, 1993; Karler y cols., 1994), la adquisición de la autoadministración (Schenk y cols, 1993) o el condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por cocaína (Cervo y Samanin, 1995; Kim y cols., 1996). En un reciente estudio, la administración

intracerebral (área tegmental ventral) de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA (AP5 y CNQX) bloquearon completamente la adquisición de la preferencia de lugar inducida por la cocaína (Harris y Aston-Jones., 2003). Por otro lado, el desarrollo de la sensibilización comportamental y las adaptaciones celulares asociadas requieren de la transmisión glutamatérgica, mientras que su mantenimiento se asocia a alteraciones en la expresión y la sensibilidad del receptor del glutamato. Además, los estudios de neuroimagen en usuarios de cocaína han demostrado que las áreas del cerebro ricas en glutamato, tal como regiones corticales y límbicas, exhiben fuertes respuestas metabólicas tanto durante la euforia inducida por la cocaína como durante el proceso que ocurre al desear intensamente dicha sustancia tras un periodo de abstinencia. (Li y cols., 2000). Se sabe también que la neurotransmisión glutamatérgica está implicada en el desarrollo y la expresión de la sensibilización tanto conductual como neuroquímica a los opiáceos y los psicoestimulantes (Pierce y Kalivas., 1997; White y Kalivas., 1998).

Basándonos en estos resultados, creemos que manipulando la transmisión glutamatérgica podría proporcionarnos un medio para intentar revertir los procesos subyacentes a la drogadicción.

3.2 Reinstauración del CPL por inyecciones priming

Los altos índices de recaída en el consumo de la droga que sigue a prolongados periodos de abstinencia, caracterizan el comportamiento de los usuarios experimentados de la heroína y de la cocaína (Shalev et al 2002). Por lo tanto, uno de los principales objetivos de la investigación en el área preclínica será explorar los procesos relacionados con la recaída al consumo de las sustancias adictivas.

El paradigma de la reinstauración de la preferencia de lugar puede ser utilizado para comprobar como una inyección *priming* de la droga

utilizada para desarrollar la preferencia de lugar condicionada, administrada tras un periodo de extinción de esta preferencia, actúa restaurando la importancia o la atracción del ambiente apareado previamente con la droga. Las inyecciones *primings* recuerdan al animal el significado de los estímulos o claves contextuales previamente asociadas con los efectos reforzantes de la droga (Mueller y Stewart., 2000).

Utilizando el paradigma de la reinstauración de la preferencia de lugar para estudiar el fenómeno de recaída, diversos autores han demostrado que la re-exposición a los opiáceos y la cocaína previamente administrados durante el condicionamiento producen el restablecimiento de este condicionamiento de lugar, después de observada la extinción (Mueller y Stewart., 2000; Itzhak y Martin., 2002; Parker y McDonald., 2000; Manzanedo y cols., 2001; Ribeiro do Couto., 2005). En seres humanos se ha demostrado que la exposición a la droga incrementa el deseo intenso de consumirla y la conducta de toma de la misma. Por otra parte, en el modelo de reinstauración empleando el paradigma de autoadministración, la re-exposición de los animales a la droga, tras la extinción de la respuesta reforzada por la misma, incrementa la tasa de respuesta. Diversos estudios han demostrado que la administración de inyecciones *primings* de cocaína inducen el restablecimiento de la autoadministración, (De Wit y Stewart., 1981; Shalev y cols., 2002) y del CPL (Mueller y Stewart., 2000; Itzhak y Martin., 2002; Busse y Riley., 2004) tras haber inducido su extinción. Los efectos reinstauradores de los *primings* de las drogas pueden ser atribuidos a las propiedades hedónicas de estas sustancias, las cuales producen un estado motivacional incentivador que reinstaura la preferencia condicionada.

Aunque en su mayoría el efecto reforzante de las drogas psicoestimulantes se relaciona fundamentalmente con alteraciones en la transmisión DA, otros sistemas neurotransmisores también parecen estar implicados. El sistema glutamatérgico está implicado en el desarrollo y la expresión de la sensibilización comportamental y neuroquímica tanto a los opiáceos como a los psicoestimulantes (Pierce y Kalivas., 1997; White y Kalivas., 1998). De Vries y cols (1998b) observaron que inyecciones sistémicas del antagonista no competitivo NMDA, MK-801, restableció la conducta de búsqueda de cocaína. En dos estudios de Cornish y Kalivas (1999, 2000) se evidencia la implicación del sistema glutamatérgico en la recaída a la cocaína. En el primer estudio observaron que infusiones intracraneales de AMPA en el ATV reinstauran selectivamente la conducta de búsqueda de la cocaína pero no por la sacarosa. Por otro lado, el antagonista del receptor AMPA, CNQX, bloqueó la recaída a la cocaína inducida por inyecciones priming de cocaína.

4. GHB



4. EL ÁCIDO GAMMA-HIDROXI-BUTIRICO (GHB)

El GHB conocido como “éxtasis líquido”, ha adquirido gran popularidad como droga recreativa en los últimos años, considerándose una de las “drug club” o drogas de discoteca, junto al éxtasis o la ketamina. Induce en los consumidores estados de euforia, relajación, un incremento de la sociabilidad y de la sexualidad y una desinhibición parecida a la producida por el etanol. También se ha descrito su utilización en ambientes culturistas debido a sus supuestos efectos anabolizantes. El GHB también produce un efecto sedante y amnésico, además de una importante bradicardia e hipotensión. Entre sus efectos más peligrosos se encuentra la aparición de coma, habitualmente reversible y de corta duración, tras pequeños incrementos en la dosis, además de la potenciación de sus efectos cuando se consume conjuntamente con etanol. El GHB suele presentarse como un líquido incoloro, sin olor y con apenas sabor (un ligero sabor salado), fácil de enmascarar con otras bebidas. Estas características, junto con el efecto amnésico e hipotónico de la droga, son especialmente preocupantes ya que existen evidencias de su uso en casos de agresión sexual o “date-rape”.

Laborit sintetizó por primera vez esta droga en 1960 (Laborit., 1964) como un análogo del neurotransmisor ácido gamma aminobutírico (GABA), pero con capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y con efectividad por vía oral (Galloway., 1997). La sustitución de un hidroxilo en posición de un grupo amino confirió esta propiedad a la nueva molécula, aunque sus efectos en animales de experimentación fueron distintos a los producidos por el GABA, tanto a nivel bioquímico como conductual. Aunque se exploró su potencial como anestésico, ya que puede inducir sueño y coma reversible, debido a sus efectos indeseables secundarios (bajo efecto

analgésico, vómitos y convulsiones) fue rechazado por la comunidad médica.

A principios de los 90, el GHB se vendía sin receta en EE.UU. como suplemento alimenticio y para el tratamiento de la ansiedad, el insomnio y para atletas y culturistas. Sin embargo a finales de 1990, la FDA (Food and Drug Administration) de los EE.UU., prohibió el GHB tras conocerse 57 casos de intoxicaciones (con náuseas, vómitos, problemas respiratorios, convulsiones y coma). Desde entonces, la droga ha sido implicada en varias muertes y en el año 2000 se añadió a la Lista I de Drogas de la Ley de Sustancias Controladas.

En el año 2002, la FDA aprobó el uso de GHB para pacientes con narcolepsia que presentan además cataplejía. Únicamente para esta indicación, se incluye la preparación comercial (Xyrem®) en la Lista III de Sustancias Controladas para uso médico, mientras que el resto de usos del GHB sigue controlado y penalizado por la Lista I.

El GHB, es un metabolito de GABA, que está presente en el cerebro de los mamíferos y ejerce un efecto neuromodulador, induciendo diversos efectos farmacológicos y conductuales en animales de experimentación. Sus principales efectos parecen ser debidos a su efecto agonista sobre receptores GABA_B y por tanto, son mediados por el sistema dopaminérgico aunque existen también receptores específicos para el GHB que podrían ser responsables de su interacción con el sistema opioide.

El mecanismo de acción del GHB no está del todo dilucidado. La hipótesis que sugiere que el sistema GABAérgico es el mecanismo de acción del GHB está basada en numerosos estudios. En primer lugar se ha descrito cierta afinidad del GHB por el receptor GABA_B (Lingenhoehl., 1999), actuando como agonista parcial, pero no por el receptor GABA_A (Serra y cols., 1991) si bien esta afinidad es a concentraciones superiores a

aquellas presentes normalmente en el cerebro. Por otra parte, en ratones GABA β -/-, el GHB no produce hipolocomoción, hipotermia, incremento en la síntesis de dopamina ni en las ondas delta del encefalograma, efectos observados en los ratones “wild-type” (Kaupmann y cols., 2003). Estas evidencias parecen indicar que al menos algunos de los efectos producidos por el GHB implican los receptores GABA β .

Se ha propuesto que el GHB actúa como un neurotransmisor o neuromodulador, ya que existe una distribución anatómica discreta y subcelular, tanto de GHB como de su enzima de síntesis, en terminales presinápticos en el cerebro (Rumigny y cols., 1981). Los lugares donde se hallan las concentraciones más altas de GHB en el cerebro son la sustancia negra (Roth., 1970) y el hipotálamo (Teter y cols., 2001). Además, existen lugares de unión específicos de alta afinidad de [3H] GHB en el cerebro de rata (Snead., 2000). Estos receptores de GHB parecen estar co-localizados en estructuras dopaminérgicas y se encuentran acoplados a proteínas G (Ratomponirina y cols., 1995).

El GHB puede modular la neurotransmisión dopaminérgica, ya sea actuando en sus propios receptores GHB o a través de los GABA. Se cree que esta modulación es la causante de gran parte de los efectos motores y conductuales del GHB. En roedores, provoca sedación y una disminución dosis-dependiente de la actividad locomotora (Kaupmann y cols., 2003; Itzhak., 2002). Estudios de microdiálisis in vivo en animales despiertos, han demostrado que GHB produce una inhibición de la liberación de dopamina (Feigenbaum y Howard., 1997). Ésta inhibición es reducida por antagonistas del receptor GABA β , lo que indica la implicación de este receptor en el efecto dopaminérgico (Nissbrandt y cols., 1994).

Diversas investigaciones indican que el GHB también podría relacionarse con el sistema opiáceo endógeno. La dinorfina o la metencefalina aumentan, en estructuras tales como el estriado o la corteza

frontal, tras la administración de GHB (Lason y cols., 1983; Gobaille et al., 1994; Schmidt-Mutter y cols., 1999). Muchos efectos del GHB en animales pueden ser imitados por agonistas (Snead y Bearden, 1980,1982) o bloqueados por antagonistas (Snead y Bearden, 1980; Vayer y cols., 1987; Vayer y Maitre, 1989) del receptor opioide. Dado que el GHB no se une a los receptores opioides, ni tampoco la naloxona se une a los receptores del GHB (Maitre, 1997; Feigenbaum y Simantov, 1996), esta relación podría depender de las acciones que el GHB ejerce sobre la dopamina u otros sistemas de neurotransmisión, como el GABAérgico (Feigenbaum y Howards, 1997).

Estudios de discriminación de drogas, de preferencia de lugar y de autoadministración (Colomo y cols., 1995,1998; Martellotta y cols., 1997; Woolverton y cols., 1999) indican que el GHB podría tener un efecto reforzante y por tanto, un claro potencial adictivo, si bien este efecto parece ser más débil que aquel producido por otras drogas como la cocaína o los opiáceos.

4.1 Papel del GHB en la adicción a los opiáceos

Aunque originalmente el GHB fue utilizado en la anestesia y en el tratamiento de la narcolepsia, más recientemente se ha hipotetizado sobre un posible papel del GHB en drogodependencias, basándose en una serie de estudios clínicos realizados principalmente en Italia.

Numerosas investigaciones sugieren que el GHB puede interferir con los sistemas cerebrales responsables de la expresión de las propiedades reforzantes agudas de las sustancias de abuso y de los cambios neuroadaptativos que acontecen en el proceso de la dependencia (Fattore y cols., 2000). Tanto el síndrome de abstinencia al alcohol como a los opiáceos está asociado a una inhibición de la actividad dopaminérgica en el estriado y en el área mesocorticolímbica. No existe un acuerdo

unánime sobre los efectos que el GHB induce sobre el sistema DA. Aunque, como hemos mencionado anteriormente, puede disminuir la liberación de DA en animales despiertos, otros estudios indican que el GHB activa este sistema. Tras una inicial atenuación de los niveles de DA (Gessa y col., 1966; Martellota., 1997), el GHB produce un aumento de la actividad de la tirosina hidroxilasa y estimula la liberación de dopamina (Spano y cols., 1971; Morgenroth y cols., 1976). Además, como también afecta al sistema opiáceo endógeno, su administración podría favorecer la desaparición del deseo y del malestar asociado a la abstinencia a las drogas (Maitre., 1997).

Diversos estudios realizados con adictos al alcohol o a los opiáceos apoyan esta hipótesis. El GHB reduce el deseo y el malestar durante la abstinencia al alcohol y a los opiáceos administrándose oralmente (a dosis no sedantes) a los individuos dependientes (Gallimberti y cols., 1989, 1992, 1993). En el tratamiento del síndrome de abstinencia del alcohol en un grupo de alcohólicos con abuso concomitante de heroína, Gallimberti y colaboradores observaron que el GHB suprimió, no solo los síntomas de la abstinencia al alcohol, sino también los síntomas de abstinencia a la heroína (Gallimberti y cols., 2000).

Los resultados anteriores, se han corroborado en estudios realizados en laboratorio en los que se constató que el GHB reduce el consumo voluntario de etanol en ratas seleccionadas por su alta preferencia innata al mismo (Fadda y cols., 1983), y alivia la sintomatología de la abstinencia al etanol en animales dependientes (Fadda y cols., 1989).

Todos estos resultados sugerirían que el GHB podría ser útil para el tratamiento del abuso a los opiáceos, aunque debido a la existencia de estudios que alertan sobre su potencial de abuso, deben de tomarse en consideración las pertinentes precauciones.

En conjunto los estudios de discriminación de drogas, de preferencia de lugar y de autoadministración indican que GHB podría tener un efecto reforzante y por tanto adictivo si bien, parece ser más débil que el producido por otras drogas de abuso como la cocaína o los opiáceos. Los estudios realizados con condicionamiento de preferencia de lugar, indican que aunque el GHB puede llegar a inducirlo, la preferencia aparece sólo tras 6 o más exposiciones a la droga, cuando en el caso de la heroína o la cocaína son necesarias muchas menos sesiones de condicionamiento (Martellotta y cols., 1997).

Existe muy poca información sobre el desarrollo de tolerancia o dependencia tras la exposición continuada al GHB, aunque existe evidencia de una cierta tolerancia a los efectos de disfunción motora en ratas y se ha constatado la aparición de una tolerancia cruzada con el etanol (Colombo y cols., 1995). Dosis anestésicas de GHB administradas a ratas dependientes de etanol sólo producen un ligero efecto sedante (Fadda y cols., 1989).

Tampoco se han realizado muchos estudios con el fin de comprobar la existencia de un síndrome de abstinencia tras la retirada del GHB, aunque Bania y colaboradores (2003) observaron la aparición de un síndrome de abstinencia en ratas después de suspender la administración de GHB cada 3 horas durante 3 o 6 días. Estudios realizados en humanos, recopilando informes de observaciones en unidades de urgencias, además de encuestas y numerosos testimonios recogidos, apuntan hacia la existencia de un síndrome de abstinencia en humanos parecido al producido por la retirada de alcohol o benzodiacepinas. Este síndrome aparece entre 1 y 6 horas después de la última dosis pudiendo prolongarse durante 15 días (Dyer y cols., 2001). Los síntomas serían insomnio, ansiedad, agitación, temblor, náuseas y vómitos. A esto le sigue una inestabilidad del sistema nervioso autónomo caracterizada por diaforesis, hipertensión, temblores y taquicardia. En caso de retirada después de un

uso crónico o de dosis altas se han descrito casos en los que se presentan síntomas psicóticos, alucinaciones y delirio (Tarabar y Nelson., 2004).

4.2 Papel del GHB en los efectos reforzantes de la cocaína

El GHB y la cocaína comparten la capacidad de estimular la neurotransmisión dopaminérgica aumentando la concentración extracelular estriatal de DA, y por lo tanto, ambos compuestos son utilizados como sustancias de abuso y podrían compartir mecanismos implicados en su uso prolongado. El GHB es capaz de interferir con los sistemas cerebrales responsables de las propiedades del refuerzo de la cocaína, ya que sus receptores de alta afinidad están presentes en estructuras DA (Hechler y cols., 1992). Hasta la fecha, la mayoría de las estrategias farmacológicas para tratar dependencia de la cocaína han apuntado directamente a la DA y otras neurotransmisiones monoaminérgicas, imitando los efectos de la cocaína en la recaptación de DA o bloqueando los efectos dopaminérgicos de la cocaína con antagonistas del receptor de DA. Desafortunadamente, estas intervenciones han sido ineficaces en ensayos controlados (Soares y cols., 2001). Un acercamiento alternativo para modular los efectos dopaminérgicos de la cocaína podría derivar del aumento de la neurotransmisión GABAérgica. En apoyo a esta idea, se ha observado que el tratamiento con agonistas GABAérgicos así como el aumento de la neurotransmisión del GABA, da como resultado una disminución de la autoadministración de cocaína en animales de laboratorio (Campbell y cols., 1999, Kushner y cols., 1999, Roberts y cols., 1996 ; Stromberg y cols., 2001). Los mecanismos GABAérgicos también se han identificado en el comportamiento de búsqueda de la droga, inducido por inyecciones priming de cocaína, estrés y por claves condicionadas en modelos de restablecimiento de la recaída en animales (Campbell et al., 1999, Fuchs et al., 2004, McFarland et al., 2004 y McFarland y Kalivas, 2001). Se cree que aumentando los niveles de GABA en la hendidura sináptica se puede

reducir los incrementos de DA inducidos por los psicoestimulantes en el núcleo accumbens, consiguiendo con ello reducir sus propiedades reforzantes. La Gabapertina, que aumenta la liberación de GABA, reduce de forma perceptible la cantidad y frecuencia del deseo intenso (craving) que sufren los pacientes dependientes de cocaína (Raby y Coomaraswamy, 2004).

5. HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS



5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las hipótesis que planteamos en la presente tesis doctoral fueron las siguientes:

1. La afectación del sistema glutamatérgico, mediante el bloqueo de los receptores NMDA, modificará el efecto antiagresivo y motor de la morfina.
2. El sistema glutamatérgico se encuentra implicado en la aparición del síndrome de abstinencia a la morfina. Es posible que el bloqueo de los receptores NMDA mediante la administración de Memantina o MK-801 provoque una disminución de los signos físicos y motivacionales, medido mediante el CAL, del síndrome de abstinencia a este opiáceo.
3. El bloqueo de los receptores NMDA o AMPA alterará los efectos reforzantes de la cocaína, medido tanto en la adquisición, la expresión como en el restablecimiento (recaída) utilizando el CPL inducido por esta droga. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos puede disminuir la recaída inducida por diferentes dosis "priming" de cocaína.
4. El GHB y por tanto el sistema GABAérgico, modificará la actividad motora y la conducta social inducida por la morfina.
5. El GHB mejorará tanto los aspectos físicos como motivacionales del síndrome de abstinencia a la morfina.
6. El GHB modificará efecto reforzante de la cocaína y prevendrá la

recaída (reinstauración) de la búsqueda de cocaína.

Con el fin de comprobar las hipótesis propuestas se realizaron los diferentes trabajos experimentales expuestos en la presente Tesis Doctoral, cuyos objetivos más concretos fueron los siguientes:

Estudio 1.

- Evaluar el efecto de diferentes dosis de memantina sobre la actividad motora y las conductas sociales y agresivas.
- Estudiar la acción de diferentes dosis de memantina sobre el efecto antiagresivo de la morfina.

Estudio 2.

- Investigar el efecto de dos antagonistas no competitivos de los receptores NMDA (memantina y MK-801) en la adquisición y expresión del Condicionamiento Aversivo de Lugar (CAL) inducido por naloxona en ratones dependientes de morfina.
- Estudiar el efecto de la memantina y el MK-801 en la expresión del síndrome físico de abstinencia inducido por naloxona en ratones dependientes de morfina.

Estudio 3.

- Evaluar los efectos motivacionales de la Memantina y del CNQX mediante el paradigma de CPL.
- Estudiar el efecto de estas dos sustancias en la adquisición, la

expresión y el restablecimiento (recaída) del CPL inducido por la cocaína.

Estudio 4.

- Evaluar el efecto de un amplio rango de dosis de GHB (ácido gamma hidroxibutírico) sobre la actividad motora espontánea y sobre la hiperactividad inducida por la morfina.
- Observar la acción del GHB sobre las conductas sociales y sobre el efecto antiagresivo de la morfina

Estudio 5.

- Evaluar la capacidad del GHB para bloquear los síntomas motivacionales del síndrome de abstinencia provocado por naloxona, en animales dependientes de morfina, mediante el condicionamiento aversivo de lugar (CAL).
- Estudiar la capacidad del GHB para bloquear la expresión de los síntomas físicos del síndrome de abstinencia provocado por naloxona, en animales dependientes de morfina.

Estudio 6.

- Evaluar el efecto del GHB sobre las acciones reforzantes de la cocaína mediante el condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL), tanto durante la adquisición como durante la expresión del mismo.
- Analizar la eficacia del GHB en el proceso de reinstauración

Hipótesis y objetivos

(recaída) de la preferencia de lugar inducida por cocaína

6. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS



Estudio 1



Estudio 1: La Memantina no bloquea los efectos antiagresivos de la morfina en ratones.

Investigación original: M. Rodríguez-Arias, C. Maldonado, M.A. Aguilar y J. Miñarro (2002). Memantine does not block antiaggressive effects of morphine in mice. *Behavioural Pharmacology* 13: 249-252

Diferentes estudios realizados por nosotros y por otros grupos de investigación, han indicado la existencia de una interacción entre el sistema glutamatérgico y el opiáceo. En un reciente trabajo se ha demostrado que la memantina reduce la conducta agresiva que se observa durante el síndrome de abstinencia a la morfina con dosis que no producen deterioro locomotor. Sugiriéndose que este antagonista de los receptores NMDA interaccione de forma específica con los procesos desencadenados por dicha abstinencia.

Con el fin de clarificar mejor la relación entre estos dos sistemas, el objetivo del presente trabajo ha sido determinar si los antagonistas de los receptores NMDA modifica el efecto que la estimulación del sistema opiáceo produce sobre la conducta agresiva, utilizando para ello el paradigma de la agresión inducida por aislamiento.

Se realizaron dos experimentos. En el primero se estudió el efecto de diferentes dosis de memantina sobre la actividad locomotora. En el segundo experimento se evaluó la acción de diferentes dosis de memantina (sola o junto con una dosis de morfina), sobre la conducta social y agresiva en ratones macho.

En el primer experimento, la actividad locomotora de los animales fue evaluada utilizando un actímetro, realizando un registro de la actividad durante cuatro horas después de la administración de suero fisiológico o

1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg de memantina. Los resultados nos indicaron que los animales tratados con 40 mg/kg de memantina mostraron un incremento de la actividad motora en comparación con los que habían recibido suero fisiológico.

En el segundo experimento, la mitad de los animales fueron alojados individualmente durante 28 días y un mismo número de animales fueron agrupados de seis en seis para ser utilizados como “anósmicos”. Los animales experimentales fueron divididos en 10 grupos en función del tratamiento recibido: una inyección de suero fisiológico o de diferentes dosis de memantina (5, 10, 20 o 40 mg/kg), o una inyección de morfina (10mg/kg) más diferentes dosis de memantina (5, 10, 20 o 40 mg/kg). Treinta minutos después de administrar el fármaco, se procedió a realizar el test, donde un animal experimental y un oponente fueron enfrentados en un área neutral durante 10 minutos, permitiéndoles adaptarse al ambiente durante un minuto antes de comenzar la prueba. Los encuentros fueron grabados con una cámara de vídeo para su posterior análisis conductual. En dichos encuentros cuantificamos el tiempo que el animal experimental dedicaba a cada una de las siguientes categorías de conducta: exploración no social, exploración social, ataque e inmovilidad. También evaluamos el total de veces que el animal experimental atacaba al oponente, parámetro denominado como unidad de ataque.

Los resultados obtenidos en las conductas de exploración no social, indicaron que todos los grupos, a excepción del tratado con 5 mg/kg de memantina mostraron un incremento en el tiempo dedicado a estas conductas con respecto al grupo control. Sólo los animales tratados con 20 mg/kg de memantina mostraron un incremento significativo en el tiempo dedicado a las conductas de investigación social. Además, todos los grupos mostraron una disminución del tiempo dedicado a la conducta de ataque así

como del tiempo requerido para realizar el primer ataque (latencia de ataque), en comparación con el grupo control.

Cabe destacar, que los grupos tratados con morfina más 5, 10 y 20 mg/kg de memantina, redujeron en mayor medida el tiempo dedicado a las conductas de ataque que los grupos a los que se administró únicamente la misma dosis de memantina. Así mismo, en la latencia de ataque se observa un incremento en los animales tratados con la dosis mayor de memantina (40 mg/kg) y en el grupo tratado únicamente con morfina o en combinación con cualquiera de las dosis de memantina. Así mismo, estos mismos grupos, presentan una disminución significativa en la unidad de ataque.

Por último, hay que señalar que todos los animales tratados con morfina junto con cualquiera de las dosis de memantina presentaron un marcado incremento en la conducta de Inmovilidad.

Adicionalmente a las conductas analizadas, se observó la aparición de Ataxia en el 62% de los animales tratados con 20 mg/kg de Memantina, en el 100% de los tratados con 40 mg/kg de memantina, en el 60% de los tratados con morfina más 20 mg/kg de memantina y en el 100% de los tratados con morfina más 40 mg/kg de memantina.

Nuestros resultados muestran que la dosis mayor de memantina incrementa de forma significativa la actividad locomotora de los animales, y que con nuestro sistema de registro no se aprecia un deterioro locomotor, aunque en el test de interacción social si que se han observado otras alteraciones de tipo motor (ataxia).

Las dosis más altas de memantina disminuyen la conducta agresiva e incrementan el tiempo dedicado por nuestros animales a las conductas de

exploración no social. Este hecho es un claro efecto de la hiperactividad asociada con el bloqueo de los antagonistas de los receptores NMDA.

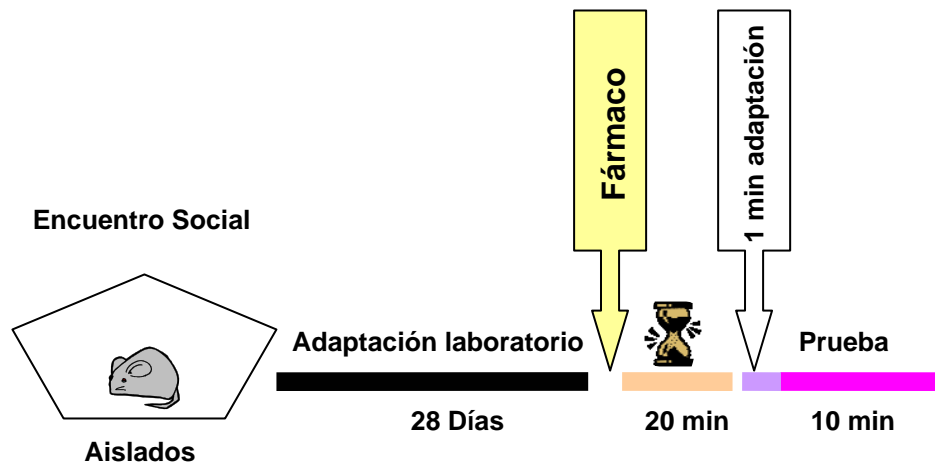
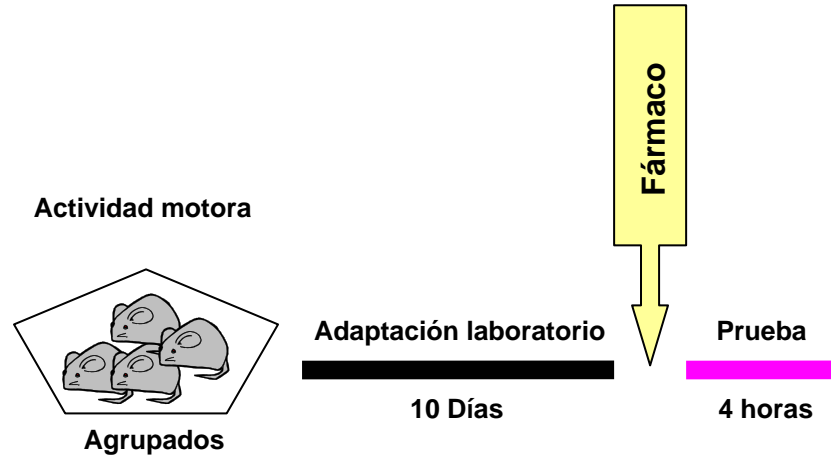
Con la dosis intermedia (20 mg/kg) la memantina produce un aumento del tiempo dedicado por los animales a las conductas de investigación social (contacto social). Este resultado podría sugerir un cierto efecto ansiolítico de la memantina ya que incrementa la sociabilidad de los animales y paralelamente provoca la disminución de las conductas agresivas.

La administración de memantina no modificó el efecto antiagresivo de la morfina con ninguna de las dosis estudiadas. Aunque se ha sugerido que los antagonistas NMDA ejercen una acción directa sobre los procesos que median la abstinencia a la morfina, nuestros resultados sugieren que la memantina no modifica el efecto que la estimulación del sistema opiáceo produce sobre la conducta agresiva ya que ninguna de las dosis de memantina empleadas en este estudio afectaron esta acción de la morfina.

Uno de los resultados más significativo obtenido en nuestro estudio fue el incremento de la inmovilidad de los animales cuando estos dos fármacos fueron administrados conjuntamente, fenómeno que no se observó al administrarlos aisladamente. Cabe resaltar que las dos dosis más altas de memantina, administradas solas o junto con morfina, produjeron ataxia en un elevado porcentaje de animales.

En conclusión podemos afirmar que la administración de memantina produce un aumento dosis-dependiente en la actividad motora y un efecto antiagresivo solamente con las dosis en las que se observa un incremento de la actividad motora. Además, la memantina no afectó a la acción antiagresiva de la morfina, siendo por lo tanto improbable que el sistema glutamatérgico participe en esta acción de la morfina.

PROTOCOLO DE ADMINISTRACION



Memantine does not block antiaggressive effects of morphine in mice

M. Rodríguez-Arias, C. Maldonado, M.A. Aguilar and J. Miñarro

Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Valencia, Spain

Correspondence to José Miñarro, Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Aptdo. 22109, 46071 Valencia, Spain. E-mail: jose.minarro@uv.es

Received 18 December 2001; accepted as revised 28 March 2002

The action of the noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blocker memantine (5, 10, 20 and 40 mg/kg) was evaluated during social encounters in mice. Although a dose-dependent increase in locomotion was observed, only with the highest dose did it reach statistical significance. Aggressive behavior was decreased with 20 and 40 mg/kg of memantine, social contacts being increased only with 20 mg/kg. Subsequently, the effect of these memantine doses on the antiaggressive actions of morphine (10 mg/kg) was evaluated. None of the doses affected the antiaggressive action of morphine. As memantine administration produced an antiaggressive effect only at doses that affected locomotion, it is unlikely that the glutamatergic system mediates the antiaggressive actions of morphine. © 2002 Lippincott Williams & Wilkins.

Keywords: memantine, aggression, motor activity, morphine, NMDA, mouse

INTRODUCTION

The present research was carried out on the basis of previous experiments which have shown the existence of an interaction between glutamatergic and opioid systems. A recent study reported that memantine significantly reduced the expression of aggression in morphine-induced withdrawal at doses that do not produce motor impairment, the authors suggesting that this is due to a specific interaction with withdrawal-triggered processes (Sukhotina and Bespalov, 2000). The aim of the present work was to determine whether NMDA receptor antagonism interacts with the opioid system, using the paradigm of isolation-induced aggression, to further clarify the relationship between these two systems.

METHODS

Subjects

Fifty male mice of the OF1 strain for the locomotor study and 184 for the social interaction test, acquired from CRIFFA (Barcelona) and aged 42 days when they arrived at the laboratory, were housed under standard conditions. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations,

which are in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

Procedure and apparatus

Memantine (Laboratorios Sigma-Aldrich Química, Madrid), morphine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber, Madrid) and physiological saline (NaCl 0.9%) were used in these experiments.

After an adaptation period to the laboratory (10 days) animals were divided into groups ($n=8$) and immediately after the drug administration were placed into activity cages for 4 hours. An actimeter composed of eight cages, each with eight infrared lights, was used to measure spontaneous locomotor activity (CIBERTEC, S.A. Spain).

For the social encounters, experimental animals ($n=92$) were housed individually for 28 days, and the other half ('standard opponents') were housed in groups of six. Animals were made temporarily anosmic by intranasal lavage with 4% zinc sulfate solution 1 day before testing (Smoothy *et al.*, 1986). Behavior was evaluated 20 min after drug administration, an experimental animal and a standard opponent being confronted with each other in a neutral cage for 10 min, with 1 min of adaptation before the encounter. All tests were videotaped and

carried out under white illumination between the second and fifth hour of the dark phase of the light/dark cycle.

The videotapes were analyzed using a PC computer and a custom-developed program (Brain *et al.*, 1989) that facilitated estimation of times allocated to several broad functional categories of behavior: nonsocial exploration, social investigation, attack and immobility. A more detailed description can be found in Rodríguez-Arias *et al.* (1998). Unit of attack (total time of attack/number of attacks) was also evaluated.

Statistical analyses

Motor activity data were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) with two factors, one 'between' (Treatment) and one 'within' (Time of recording the data), with four levels (1st, 2nd, 3rd and 4th hour). *Post-hoc* comparisons (Newman-Keuls) were subsequently made.

Data of the social encounter were initially analyzed using the Kruskal-Wallis test. For the behavioral categories in which this test was significant, differences between groups were examined by the two-tailed Mann-Whitney *U* test.

RESULTS

Experiment 1: Motor effects of memantine

ANOVA revealed significant effects of Treatment [$F(6,48)=5.66$; $P<0.001$] and Time of recording [$F(3,18)=3.61$; $P<0.015$]. *Post-hoc* analysis showed that locomotor activity was increased significantly by 40 mg/kg memantine (Figure 1).

Experiment 2: Antiaggressive and social effects of memantine

Table 1 shows median values (in s) allocated to the behavioral categories.

In *nonsocial exploration* (Kruskal-Wallis $P<0.0001$), with the exception of the mice treated with 5 mg/kg memantine, all animals showed a significant increase with respect to the saline-treated group (see significance in Table 1). In addition, the Mem40 group increased this time with respect to the other three memantine groups ($P_s<0.002$), and the Mem20 group was higher with respect to the Mem5 group ($P<0.05$). The Mor10 group showed an increase in this behavior with respect to Mem5 and Mem10 groups ($P_s<0.02$). Administration of morphine plus 5 mg/kg of memantine increased this behavior in comparison with the Mem5 group ($P<0.02$). Groups Mor10+M20 and Mor10+M40 showed a lower increase than Mor10 ($P<0.05$) and Mem40 ($P<0.02$).

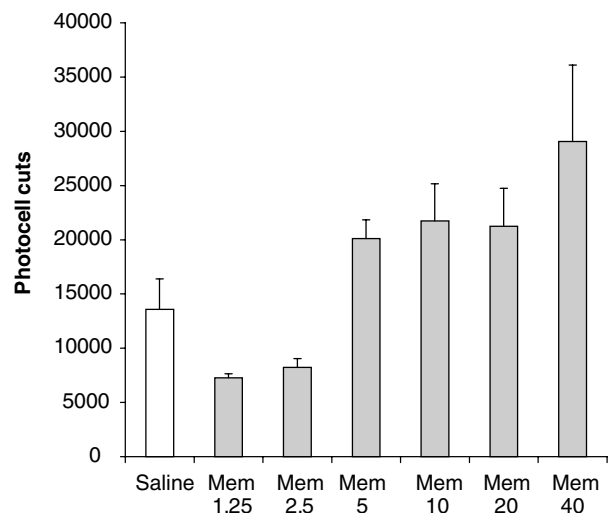


FIGURE 1. Effect of memantine on spontaneous locomotor activity in mice for 4 hours after administration. Data are mean counts \pm SEM. *Post-hoc* comparisons (Newman-Keuls): * $P<0.05$ with respect to saline group.

Only animals treated with 20 mg/kg of memantine showed a significant increase in time spent in *social investigation* (Kruskal-Wallis $P<0.001$) when compared to controls ($P<0.002$), Mor10 and Mor10+M20 ($P_s<0.001$). Animals belonging to Mor10+M5 and Mor10+M10 groups showed a significant decrease when compared with Mor10, Mem5 and Mem10 ($P_s<0.02$).

Aggression (*attack* and *attack latency*, Kruskal-Wallis test, $P<0.001$) was reduced in treated animals in comparison to the saline group (see significance in Table 1). The highest memantine dose (40 mg/kg) also decreased attack significantly more than Mem20 ($P<0.02$), and Mem20 significantly more than Mem10 ($P<0.05$). Morphine plus 5, 10 and 20 mg/kg of memantine diminished this behavior to a greater extent than did these memantine doses alone ($P_s<0.01$). Latency of attack was significantly increased in the Mem40 group compared to the other groups ($P<0.05$ for Mem5 and Mem10, and $P<0.02$ for Mem20), and Mem20 also increased this time compared with Mem10 ($P<0.02$). Morphine administration lengthened this time in comparison with Mem10 ($P<0.05$), as did morphine plus the three lower memantine doses in comparison with memantine alone ($P<0.01$).

Mice treated with the 40 mg/kg dose of memantine, morphine alone or morphine plus any memantine dose showed a significant decrease in the *unit of attack* (Kruskal-Wallis $P<0.001$) with respect to controls ($P_s<0.002$). Mem5 increased this measure relative to Mem40 and Mor10+M5 ($P_s<0.02$). The Mem10 and Mem20 groups also showed a higher unit

TABLE 1. Median values (in s) allocated to broad behavioral categories in animals receiving one single injection of saline, 5, 10, 20 or 40 mg/kg of memantine, or two injections of 10 mg/kg of morphine plus saline, and 10 mg/kg of morphine plus 5, 10, 20 or 40 mg/kg of memantine

	Saline (n=10)	Mem 5 (n=10)	Mem 10 (n=10)	Mem 20 (n=8)	Mem 40 (n=8)	Mor10-V (n=10)	Mor10+M5 (n=10)	Mor10+M10 (n=10)	Mor10+M20 (n=8)	Mor10+M40 (n=8)
Nonsocial exploration	386 (281-507)	406 (297-576)	461 ^{***} (382-579)	506 ^{***} (410-542)	563 ^{***} (480-596)	547 ^{***} (434-600)	564 ^{***} (400-591)	508 ^{**} (330-600)	457 [*] (370-530)	468 [*] (409-555)
Social investigation	3 (0-13)	8 (0-23)	6 (0-39)	64 ^{***} (25-169)	10 (0-80)	3 (0-34)	0 (0-4)	0 (0-3)	0 (0-6)	0 (0-22)
Attack	118 (36-188)	67 (0-221)	74 (0-165)	9 ^{***} (0-40)	0 (0-24)	0 (0-168)	0 (0-200)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Immobility	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	23 (0-200)	68 ^{***} (0-273)	144 ^{***} (53-230)	128 ^{***} (35-192)
Attack latency	17 (1-53)	53 (3-600)	17 (1-600)	558 ^{***} (2-600)	600 ^{***} (66-600)	600 ^{***} (18-600)	600 ^{***} (600-600)	600 ^{***} (600-600)	600 ^{***} (600-600)	600 ^{***} (600-600)
Unit of attack	3 (2-5)	2 (0-7)	4 (0-7)	3 (0-5)	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

The Kruskal-Wallis test shows significant variance in all the behaviors shown ($P < 0.001$). Differs from controls in the two-tailed Mann-Whitney U-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.002$.

of attack than Mem40, Mor10 and Mor10+M10 and Mor10+M20 ($P_s < 0.02$).

All the animals treated with morphine and any of the doses of memantine showed a significant increase in *immobility* (Kruskal-Wallis test, $P < 0.001$) in comparison with controls, Mor10-V and memantine administration alone ($P_s < 0.002$). The Mor10+M20 and Mor10+M40 groups also show an increase when compared with Mor10+M5 ($P < 0.02$) and in addition, Mor10+M20 increased immobility more than Mor10+M40 ($P < 0.02$).

Although it is not a behavior studied in our ethogram, ataxia was observed in 62% of the animals in the Mem20 group, 100% of the Mem40 group, 60% of Mor10+M20 and 100% of Mor10+M40.

DISCUSSION

Our results show that memantine administration significantly increased motor activity at the dose of 40 mg/kg. Decrements as well as increments have been observed regarding the motor effect of memantine in mice (Youssif and Ammon, 1986; Geter-Douglass and Witkin, 1999; Neznanova *et al.*, 2000). With our recording system, the results did not confirm an impairing motor effect of memantine, although in the social interaction test, other motor alterations (ataxia) were evident.

The highest memantine doses (20 and 40 mg/kg) produced observable changes in almost all the behaviors studied during the social interaction test, with a practical abolition of aggressive behaviors. Our results are in agreement with those observed recently by Belozertseva and Bespalov (1999), who found a significant reduction in aggressive behavior, although with a concomitant reduction in motor activity. Interestingly, a dose-dependent increase in time dedicated to nonsocial exploration was observed after memantine administration. This is a clear motor behavior and thus, an increase would reflect a hyperactivity widely associated with NMDA antagonists (Pierce and Rebec, 1993; Freed, 1994).

At 20 mg/kg memantine increased the time spent in social contacts. This dose produced a decrease in the aggressive behaviors of the animals with a concomitant increase in sociability, which could suggest an anxiolytic effect (File, 1980, 1985; Willner *et al.*, 1989; File *et al.*, 2001). Although, the effects of memantine on social behavior have not been described in previous studies, MK-801 has been found to increase social behavior during a social encounter, suggesting a benzodiazepine-like effect of this compound (McAllister, 1990).

Administration of different doses of memantine did not modify the clear antiaggressive effect of mor-

phine. In a recent study, Sukhotina and Bespalov (2000) observed that memantine administration decreased morphine withdrawal-induced aggression. It has been suggested that NMDA antagonists exert a direct action on the processes that produce withdrawal (Feng *et al.*, 1995; Kogan and Aghajanian 1995; Sepulveda *et al.*, 1998), but our results show that memantine does not affect morphine-induced antiaggressive effects at any of the doses employed, independently of whether antiaggressive effects were present or not.

In addition, administration of 20 and 40 mg/kg of memantine counteracted, at least in part, the increase in nonsocial exploration produced by morphine. But the most important result when these two drugs were jointly administered was the increment in immobility, which was not observed when the drugs were administered alone. It has to be pointed out that the two higher memantine doses, alone or with morphine, produced ataxia in a great number of animals. An increase in lethality and catalepsy has been previously described after co-administration of morphine and MK-801 (Trujillo and Akil, 1991).

In conclusion, memantine administration produced a dose-dependent increase in motor activity and an antiaggressive effect only at doses that increased locomotion. Memantine did not affect the antiaggressive action of morphine. It is therefore unlikely that the glutamatergic system mediates this action of morphine.

Acknowledgements

This research was supported by grant PB98-1497 from Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia y Tecnología, and by a grant from Dirección General de Drogodependencias, Conselleria de Bienestar Social, Generalitat Valenciana, Spain. We wish to thank Ms Miriam Phillips for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

- Belozertseva IV, Bespalov AY (1999). Effects of NMDA receptor channel blockade on aggression in isolated male mice. *Aggressive Behav* **25**:381–396.
- Brain PF, McAllister KH, Wamsley SV (1989). Drug effects on social behaviors. In: *Methods in Ethopharmacology. Psychopharmacology (series: Neuromethods, vol. 13)*. Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ (editors). Clifton, NJ: The Human Press, pp. 687–739.
- Feng YZ, Zhang T, Rockhold RW, Ho IK (1995). Increased locus coeruleus glutamate levels are associated with naloxone-precipitated withdrawal from butorphanol in the rat. *Neurochemical Res* **20**:745–751.
- File SE (1980). The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of clordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* **2**:219–238.
- File SE (1985). Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: Social behaviour. *Neuropsychobiology* **13**:55–62.
- File SE, Cheeta S, Akanezi C (2001). Diazepam and nicotine increase social interaction in gerbils: a test for anxiolytic action. *Brain Res* **888**:311–313.
- Freed WJ (1994). Glutamatergic mechanisms mediating stimulant and antipsychotic drug effects. *Neurosci Biobehav Rev* **18**:111–120.
- Geter-Douglass B, Witkin JM (1999). Behavioral effects and anticonvulsant efficacies of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice. *Psychopharmacology* **146**:280–289.
- Kogan JH, Aghajanian GK (1995). Long-term glutamate desensitisation in locus coeruleus neurons and its role in opiate withdrawal. *Brain Res* **689**:111–121.
- McAllister KH (1990). Ethological analysis of the effects of MK-801 upon aggressive male mice: Similarity to clordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav* **37**:101–106.
- Neznanova ON, Blokhina EA, Sukhotina IA, Bespalov AY (2000). Motor impairment produced by ethanol and site-selective NMDA receptor antagonists in mice: tolerance and cross-tolerance. *Alcohol* **20**:31–36.
- Pierce RC, Rebec GV (1993). Intra-neostriatal administration of glutamate antagonists increases behavioural activation and decreases neostriatal ascorbate via nondopaminergic mechanisms. *J Neurosci* **13**:4272–4286.
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Pinazo J, Simón VM (1998). Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur Neuropsychopharmacol* **8**:95–103.
- Sepulveda MJ, Hernandez L, Rada P, Tucci S, Contreras E (1998). Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* **60**:255–262.
- Smoothy R, Brain PF, Berry MS, Haug M (1986). Alcohol and social behaviour in group-housed female mice. *Physiol Behav* **37**:689–694.
- Sukhotina IA, Bespalov AY (2000). Effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and MRZ 2/579 on morphine withdrawal-facilitated aggression in mice. *Psychopharmacology* **149**:345–350.
- Trujillo KA, Akil H (1991). The NMDA receptor antagonist MK-801 increases morphine catalepsy and lethality. *Pharmacol Biochem Behav* **38**:673–675.
- Willner P, Sampson D, Phillips G, Fichera R, Foxlow P, Muscat R (1989). Effects of isolated housing and chronic antidepressant treatment on cooperative social behavior in rats. *Behav Pharmacol* **1**:85–90.
- Youssif N, Ammon HPT (1986). Potentiation of the locomotor activity of memantine by aminophylline. *Arzneimittelforschung* **36**:1717–1720.

Estudio 2



Estudio 2: La memantina presenta efectos diferentes del MK-801 en los signos motivacionales y físicos en la abstinencia a la morfina.

Investigación original: C. Maldonado, O.Cauli, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar y J. Miñarro (2003). Memantine presents different effects from MK-801 in motivational and physical signs of morphine withdrawal. Behavioural Brain Research 144: 25-35.

Numerosas investigaciones han sugerido que el aumento de la neurotransmisión dopaminérgica en áreas mesolímbicas, tales como el “*shell*” del núcleo accumbens (NAcc), desempeña un importante papel en la adicción, puesto que un aumento de los niveles de dopamina en estas estructuras es una característica común de las sustancias de abuso. A pesar de ello, los antagonistas dopaminérgicos no han demostrado ser tratamientos eficaces ni seguros en la adicción a los opiáceos.

El NAcc recibe aferencias glutamatergicas de áreas cerebrales tales como el complejo amigdalino, la formación hipocámpal y las cortezas frontales y prelímbicas. Por otra parte, fibras glutamatergicas conectan la corteza prefrontal con el área tegmental ventral donde se originan las vías dopaminérgicas que se proyectan al mencionado núcleo. Igualmente, el núcleo basolateral del complejo amigdalino se conecta por medio de una vía glutamatergica con el NAcc. Esta extensa red nerviosa dentro del sistema límbico sugiere que la neurotransmisión glutamatergica podría desempeñar un papel relevante en los procesos neuroadaptativos inducidos por los opiáceos. Además, diferentes estudios nos indican, que durante la abstinencia a los opiáceos el sistema glutamatergico permanece hiperactivo.

La exposición crónica a los opiáceos produce cambios tanto comportamentales como neurales, conocidos como tolerancia y dependencia física. Estos fenómenos representan cambios adaptativos del sistema nervioso ante la exposición crónica a los opiáceos y se relacionan con el fenómeno de la plasticidad neural. Entre los receptores del glutamato, los NMDA juegan un papel importante en la potenciación a largo plazo, y por tanto estarían implicados en la plasticidad neural relacionada con los opiáceos. La activación de los receptores NMDA parece ser necesaria para la expresión de diferentes efectos comportamentales y fisiológicos de los opiáceos, puesto que el bloqueo de estos receptores inhiben el desarrollo de tolerancia y dependencia física a la morfina. También se ha observado que este bloqueo previene el condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL) inducido por morfina en ratones y ratas, la expresión del comportamiento agresivo en ratones dependientes a morfina y la adquisición de la autoadministración intravenosa de morfina en ratones. Por otra parte, los antagonistas del receptor NMDA inyectados en el NAcc no causan ningún efecto sobre la autoadministración de heroína en ratas o sobre otros cambios de comportamiento, tales como la sensibilización motora inducida por la exposición repetida a opiáceos.

Tras la interrupción en el consumo de opiáceos, los adictos experimentan una abstinencia caracterizada por un estado de disforia y ansiedad acompañada por alteraciones físicas periféricas que se deben a la dependencia psíquica y física desarrollada por la exposición a los opiáceos. La abstinencia es un fenómeno que contribuye a que el sujeto continúe administrándose la droga, incluso aunque no sea la causa directa, puesto que incluso muchos años después de la desintoxicación, la recaída puede aparecer. Por lo tanto, los fármacos que bloquean tanto el desarrollo como la expresión de la dependencia a los opiáceos podrían ser útiles en la desintoxicación del adicto a estas sustancias. El modelo animal usado con más frecuencia para evaluar los aspectos motivacionales de la abstinencia a

la morfina es el condicionamiento aversivo de lugar (CAL) inducido por naloxona. Este modelo emplea un condicionamiento Pavloviano clásico ya que los animales evitan los estímulos ambientales asociados previamente con reforzadores negativos tales como naloxona.

En este trabajo, investigamos el efecto de dos antagonistas no competitivos del receptor NMDA, la memantina y el MK-801, en la adquisición y la expresión de la aversión de lugar inducida por naloxona en ratones dependientes de la morfina. Adicionalmente, hemos estudiado el efecto de ambos fármacos en la expresión del síndrome físico de abstinencia inducido por naloxona, midiendo diferentes parámetros comportamentales y fisiológicos. Con el fin de probar la hipótesis de que los antagonistas de NMDA podrían bloquear el desarrollo de la dependencia y que este efecto podría ser debido a un aprendizaje dependiente de estado, se estudió la aversión (CAL) y el síndrome físico en ratones que recibían morfina más memantina o MK-801 durante el desarrollo y el mantenimiento de la dependencia a la morfina, incluyendo los días en los que se midieron los comportamientos (aversión de lugar y síndrome físico).

En el primer experimento (CAL), con el fin de inducir la dependencia a la morfina se administró a todos los grupos un tratamiento dosis crecientes de este opiáceo (6, 12, 25, 50 y 100 mg/kg) cada 24 horas. La dosis más alta (100 mg/kg) se alcanzó el quinto día y fue mantenida durante todo el condicionamiento (9 días). En los grupos en el que la dependencia fue inducida al mismo tiempo que se boqueaban los receptores NMDA, los animales recibieron el mismo tratamiento con morfina, pero además se les administraba una inyección de memantina (5 y 10 mg/kg) o MK-801 (0.1, 0.05, 0.0025 mg/kg).

Para evaluar el CAL inducido por naloxona, se utilizaron cuatro cajas idénticas de "Plexiglas", con dos compartimentos de igual tamaño, que

diferían en el color de sus paredes (blanco/negro) y en la textura del suelo (liso/rugoso), separados por un área central. El procedimiento, no sesgado (“unbiased”) y contrabalanceado en términos de la preferencia inicial y del procedimiento de administración de los fármacos, constaba de tres fases. En la primera fase, llamada de pre-condicionamiento, los animales tenían libre acceso a los compartimentos durante 20 minutos (1200 segundos), registrándose el tiempo pasado en cada uno ellos. Los animales que mostraron una fuerte aversión o preferencia por alguno de los compartimentos (menos de 300 s o más de 900 s) fueron descartados del experimento. Un compartimento fue elegido para ser asociado con la naloxona y el otro con el suero fisiológico, de tal manera que dentro de cada grupo la mitad de los animales recibieron el tratamiento en el lugar menos preferido y la otra mitad en el más preferido (contrabalanceo por preferencia). Después de la asignación de compartimentos, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que permanecían en el lugar pareado con la naloxona o con el vehículo en la fase de pre-condicionamiento.

En la segunda fase, denominada de condicionamiento, los animales recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante veinte minutos en el compartimento elegido para ser asociado con el vehículo y a las veinticuatro horas recibían la naloxona antes de ser confinados durante el mismo periodo de tiempo en el compartimento elegido para ser asociado con el fármaco (los grupos apropiados, recibían memantina o MK-801 en lugar de la naloxona treinta minutos antes del confinamiento). En cinco grupos, los animales fueron inyectados con MK-801 (0.3, 0.1 y 0.05mg/kg) o memantina (10 y 5 mg/kg) treinta minutos antes de recibir la naloxona para verificar si éstos fármacos eran capaces de bloquear la aversión inducida por la naloxona durante la fase de condicionamiento (grupos de adquisición). En los animales a los que se les administró la morfina junto con un antagonista NMDA durante la inducción

de la dependencia se empleo el mismo procedimiento (morfina + MK-801 +naloxona o morfina + memantina +naloxona).

Durante la tercera fase, llamada post-condicionamiento (test), se registraba el tiempo que el animal, libre de cualquier tratamiento, pasaba en cada compartimiento durante 20 minutos. Adicionalmente a los grupos anteriormente mencionados, en otros ocho grupos los animales recibieron memantina (10 y 5 mg/kg) o MK-801 (0.3, 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 y 0.006 mg/kg) 30 minutos antes de realizar la prueba, para determinar si éstos fármacos eran capaces de bloquear la aversión condicionada inducida por la naloxona (grupos de expresión). La diferencia, en segundos, entre el tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la naloxona entre el día de pre-condicionamiento y del post-condicionamiento es una medida del grado de aversión inducido por la naloxona. Si no existen diferencias, significa que el tratamiento ha bloqueado el condicionamiento aversivo de lugar inducido por la naloxona, mientras que lo opuesto indicaría que el tratamiento no ha sido capaz de bloquear esta aversión.

Los resultados mostraron que los grupos que recibieron morfina junto con 5 mg/kg de memantina o junto con 0.025 mg/kg de MK-801 durante la inducción de la dependencia presentaron aversión. Cuando la memantina o el MK-801 fueron administrados en la fase de adquisición del condicionamiento, el CAL sólo se observó con la dosis de 5 mg/kg de memantina y con 0.05 mg/kg de MK-801. Por otro lado, la administración de MK-801 bloqueó la expresión del CAL con todas las dosis administradas. Cuando se administró la memantina durante la expresión del condicionamiento, el CAL se observó solamente con la dosis de 5 mg/kg.

En el segundo experimento, estudiamos el efecto de la memantina y el MK-801 en la expresión del síndrome físico inducido por la naloxona en ratones dependientes de la morfina. El programa de inducción de

dependencia a la morfina duró 11 días, inyectándose dosis crecientes de morfina (6, 12, 25, y 100 mg/kg) durante los cinco primeros días hasta llegar a la dosis máxima (100 mg/kg), manteniendo esta dosis durante 6 días más. Los grupos control recibieron una inyección de suero fisiológico una vez al día durante el mismo periodo de tiempo. Para inducir la abstinencia a la morfina, se administró 1 mg/kg de naloxona el día de la prueba. Con el propósito de evaluar el efecto del bloqueo de los receptores NMDA en animales dependientes, en cinco grupos adicionales tras la inducción de la dependencia a la morfina se les inyectó diferentes dosis de memantina o MK-801 treinta minutos antes de la realización de la prueba. Adicionalmente, a cinco grupos más se les administró los mismos fármacos pero treinta minutos antes de inyectarles la naloxona, mostrando estos grupos el efecto del bloqueo de los receptores NMDA sobre la intensidad del síndrome de abstinencia físico. Por último, en cinco grupos más, la dependencia a la morfina fue inducida bajo el bloqueo de los receptores NMDA, donde las diferentes dosis de morfina fueron administradas junto con la memantina (5 y 10 mg/kg) o el MK-801 (0.1, 0.05 y 0.025 mg/kg).

Los días en que se realizaba la prueba conductual, los animales eran pesados y se les inyectaba la dosis correspondiente de morfina o suero fisiológico. Transcurridos treinta minutos, se les inyectaba memantina, MK-801 o suero fisiológico en función de la condición experimental a la que pertenecía cada grupo. Por último, inmediatamente antes de la prueba, a los ratones se les inyectó suero fisiológico o naloxona (según el grupo experimental) y se procedía a la grabación en video de la conducta del animal durante veinte minutos. A los cuarenta minutos de finalizar la prueba, se volvía a pesar a los animales.

La prueba conductual fue grabada con una cámara de vídeo con el fin de proceder a su ulterior análisis mediante un programa de ordenador (Ratón time) que permite la valoración del tiempo dedicado por los animales

a cada categoría de conducta. Todas las valoraciones se realizaron mediante la técnica de “simple ciego”. Las conductas evaluadas fueron las siguientes: frecuencia de temblor de patas, de temblor de cuerpo y de saltos; ausencia o presencia de ptosis y diarrea; y por último, el tiempo dedicado a la conducta de aseo genital. Además de estas conductas, se calculó el porcentaje de pérdida de peso de los animales. También, se realizó una valoración única para cada grupo, usando una modificación de la escala descrita por Gellert y Holtzman en la que se distinguen dos clases de signos. Los signos considerados como cuantificables fueron los siguientes: pérdida de peso (cada 1% de pérdida de peso se cuantificó como 1); número de saltos (1-4 cuantificado como 1, 5-9 cuantificado como 2, y >10 cuantificado como 3); número de temblores de cuerpo (1-2 cuantificado como 2, >3 cuantificado como 4). Los signos observables, en los que sólo se evaluó su presencia o ausencia, fueron los siguientes: diarrea (2), ptosis (2), postura anormal (3) y erección o eyaculación (aseo genital) (2).

La categoría de saltos sólo fue observada en cuatro grupos de animales dependientes: los que recibieron sólo naloxona, 5mg/kg de memantina de forma crónica o aguda más naloxona y los que recibieron la dosis de 0.025 mg/kg de MK-801 de forma crónica junto con naloxona. Los temblores de cuerpo fueron observados en todos los grupos dependientes a morfina que recibieron naloxona, excepto en los grupos tratados de forma crónica con las dosis mayores de memantina (10 mg/kg) y MK-801 (0.1 mg/kg). La categoría de temblor de patas fue observada en todos los grupos dependientes a la morfina que reciben naloxona, aunque existe un aumento significativo de esta conducta en los animales dependientes que recibieron sólo naloxona con respecto al resto de grupos, a excepción del grupo dependiente de morfina que recibió 5 mg/kg de memantina (tratamiento agudo) junto con naloxona. Por último, en la escala de Gellert-Holtzman cabe destacar la diferencia significativa que existe entre el grupo

dependiente de morfina que recibió sólo naloxona y los grupos dependientes que recibieron junto a la naloxona las dosis mayores de memantina (10 mg/kg) y MK-801 (0.1 mg/kg) de forma crónica o aguda.

El principal resultado del presente trabajo es que los dos antagonistas del receptor NMDA, la memantina y el MK-801, son capaces de bloquear el CAL inducido por la abstinencia a la morfina. Por el contrario, se observan diferencias entre estos fármacos en relación con su capacidad para disminuir la intensidad de los signos físicos de la abstinencia. Mientras que la memantina reduce de forma consistente la incidencia de saltos, temblores de cuerpo o patas y la puntuación total en la escala de Gellert-Holtzman, el MK-801 disminuye el número de saltos, provocando una acción menos consistente en el resto de las conductas evaluadas. Adicionalmente, hemos observado una disminución en la dependencia a la morfina al administrar ambos fármacos durante el desarrollo de dicha dependencia, ya que no se llegó a establecer CAL y los signos físicos de la abstinencia fueron menos evidentes.

Ninguno de los antagonistas del receptor NMDA utilizados en este estudio produjo efectos motivacionales en ratones dependientes de la morfina, ya que no se observó preferencia o aversión tras el proceso de condicionamiento. Una vez que se ha establecido el CAL, la administración de la memantina o del MK-801 bloquea tanto la adquisición como la expresión de este condicionamiento. Por tanto, por lo que se refiere a los aspectos motivacionales de la abstinencia a la morfina, hemos observado como ambos antagonistas consiguieron bloquear el establecimiento del CAL. Puesto que el sistema dopaminérgico parece desempeñar un papel importante en los estados de recompensa y aversión asociados con la dependencia a la morfina, la interacción entre los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico podría explicar los efectos inhibitorios de la memantina y el MK-801 en el CAL inducido por la morfina.

En nuestro estudio, los ratones dependientes de la morfina desarrollaron un claro síndrome de abstinencia físico tras la administración una dosis alta de naloxona (1 mg/kg). Contrariamente a los resultados obtenidos en el primer experimento, ambos antagonistas NMDA presentan diferentes efectos en la expresión del síndrome de abstinencia físico. La administración de 10 mg/kg de memantina 30 minutos antes de inyectar la naloxona previene la aparición de los signos físicos característicos del síndrome de abstinencia a la morfina. Sin embargo, el MK-801 no es capaz de bloquear el síndrome físico con las dosis estudiadas. Además de estos resultados, hemos demostrado que la memantina y el MK-801 son capaces de interferir con el desarrollo normal de la dependencia de la morfina.

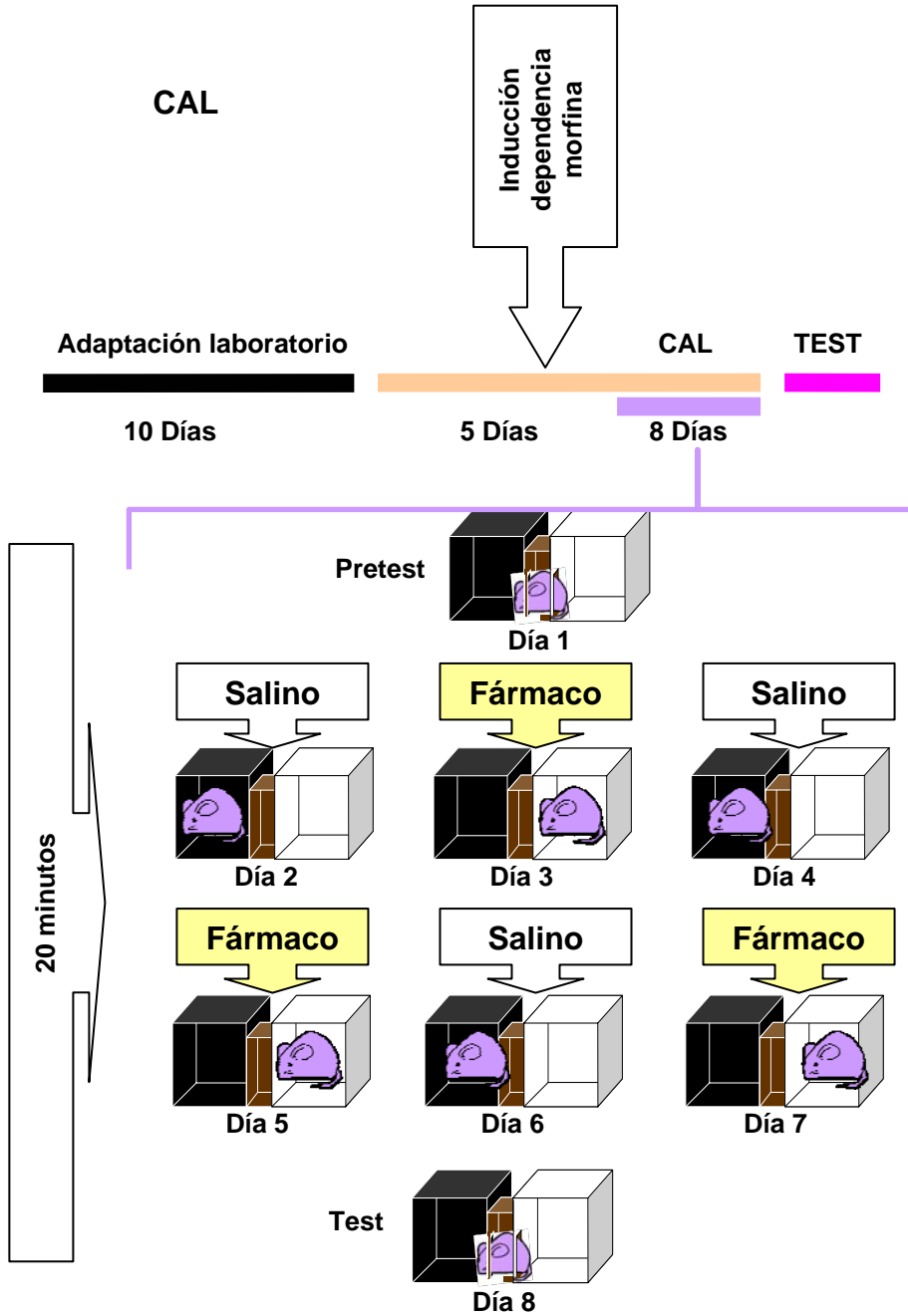
Las diferencias más importantes entre ambos antagonistas es probablemente la cinética de acoplamiento al receptor. Mientras que el acoplamiento del MK-801 exhibe una cinética de bloqueo y desbloqueo lento, así como poca dependencia del voltaje, el acoplamiento de la memantina presenta una cinética de bloqueo y desbloqueo rápido y una fuerte dependencia del voltaje. Así el MK-801 puede tener una propensión más alta que la memantina en interferir no solamente con la actividad glutamatergica tónica sino también con la actividad fásica del receptor NMDA, lo que podría explicar en parte el diferente perfil conductual observado, de estas sustancias, en la dependencia a los opiáceos.

Es probable que los escasos resultados obtenidos con tratamientos farmacológicos en la adicción a los opiáceos, por ejemplo utilizando la clonidina, se debe al hecho de que estas sustancias no afectan a los aspectos motivacionales del síndrome de abstinencia a los opiáceos. Por lo tanto, los fármacos capaces de disminuir estos aspectos motivacionales de la abstinencia podrían ser consideradas como tratamientos altamente beneficiosos en la dependencia a los opiáceos. Tales efectos inhibitorios,

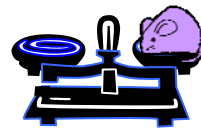
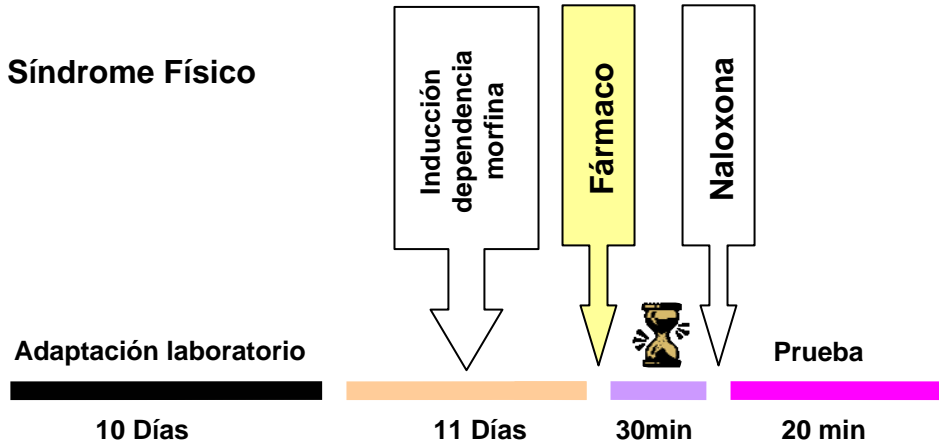
según hemos observado en el procedimiento del CAL, han sido demostrados tanto para la memantina como para el MK-801. El hecho de que el MK-801 ejerza pocos efectos sobre los signos físicos de la abstinencia y, además, presente considerables efectos secundarios, hace de la memantina una herramienta farmacológica opcional en el tratamiento de la adicción a los opiáceos.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los receptores NMDA, están implicados tanto en los signos motivacionales como físicos de la abstinencia a la morfina, ya que son necesarios para el establecimiento tanto del CAL como para la expresión del síndrome físico. Los antagonistas utilizados presentan un perfil comportamental diferente con respecto a la abstinencia a la morfina. La memantina bloquea ambos aspectos de la abstinencia, mientras el MK-801 es más eficaz bloqueando el CAL, siendo poco efectivo en el síndrome físico. Cuando la dependencia se desarrolla bajo el bloqueo de los receptores NMDA, los dos fármacos son capaces de inhibir ambos aspectos de la abstinencia. Estos resultados sugieren que el funcionamiento de los receptores NMDA son necesarios para el establecimiento de la dependencia a la morfina, como se deduce al observar la reducción o incluso abolición de los signos físicos y motivacionales de la abstinencia cuando se bloquean estos receptores.

PROTOCOLO DE ADMINISTRACION



Síndrome Físico



40 min después

Research report

Memantine presents different effects from MK-801 in motivational and physical signs of morphine withdrawal

C. Maldonado, O. Cauli, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro*

Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Aptdo. 22109, 46071 Valencia, Spain

Received 11 December 2002; received in revised form 3 February 2003; accepted 3 February 2003

Abstract

Adaptive changes in neural systems due to chronic opiate exposure are related to the neural plasticity phenomenon, NMDA receptors being implicated in these processes, e.g. tolerance, dependence or withdrawal. In this work, we investigated the effect of two non-competitive NMDA antagonists, memantine and MK-801, in motivational (Conditioned Place Aversion paradigm, CPA) and physical aspects of morphine withdrawal. After the induction of morphine dependence, animals in which the CPA was studied, received memantine (5 and 10 mg/kg) or MK-801 (0.3–0.006 mg/kg) either during the acquisition (conditioning) or expression (test) phase of this procedure. Both drugs were capable of inhibiting conditioned aversion when administered in any phase. In a second experiment, the effects of these drugs were evaluated in the intensity of the physical signs of withdrawal, only memantine administration being efficient. In addition to these studies, the intensity of morphine dependence was investigated under the blockade of NMDA receptors, i.e. morphine was co-administered with memantine or MK-801. These animals did not develop CPA and present less intensity in the physical signs of morphine withdrawal. Our results support the idea that NMDA receptors are involved in the behavioural changes and therefore in the neural adaptations produced by repeated morphine administration.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Memantine; MK-801; Morphine; Withdrawal; CPA; Physical syndrome

1. Introduction

Among drugs of abuse, opiate addiction is an enduring affliction for many and is associated with premature mortality and high morbidity. An increase of dopaminergic neurotransmission in mesolimbic areas such as the *shell* of the nucleus accumbens (NAccs) is believed to play a pivotal role in drug addiction since an increase of dopamine in this area is a common feature of drugs of abuse irrespectively of their specific molecular targets [2,5,19,37,68,86]. Lesion of mesoaccumbens fibres or dopamine receptor blockade into NAccs prevent morphine effects in animal models of drugs of abuse such as self-administration, intracranial self-stimulation, and conditioned place preference (CPP) [1,9,20,24,27,45,48,58,72,74]. Despite the enhancement of dopamine transmission in mediating the rewarding effects of morphine and other drugs of abuse, dopamine receptor antagonists have been shown to be neither effective nor safe drug treatment in opioid addiction [63].

NAcc receives glutamatergic efferents from allocortical areas such as the amygdaloid complex, hippocampal formation, and the frontal and prelimbic cortices. Moreover, glutamatergic fibres connect the prefrontal cortex to the ventral tegmental area from which dopaminergic fibres projecting to the NAcc originate. In addition, glutamatergic fibres connect the basolateral nucleus of amigdala complex to NAcc, while the central nucleus projects to the ventro tegmental area. This wide neural network within the limbic system suggests that the glutamate neurotransmission might play a relevant role in the neuroadaptive processes induced by opiates. In addition, several studies have indicated that the glutamatergic system might be hyperactive during opioid withdrawal [33,66,69,71].

Chronic exposure to opiates elicits behavioural and neural changes known as tolerance and physical dependence [54]. These phenomena represent adaptive changes in neural systems to chronic opiate exposure and are related to the neural plasticity phenomenon [49]. Among glutamate receptors, NMDA receptors have been implicated in neuronal plasticity, e.g. long-term potentiation [55] and are involved in opiate-related neural plasticity: tolerance, dependence and withdrawal [29,49]. Activation of NMDA receptors appears

* Corresponding author. Tel.: +34-96-386-44-20x56293; fax: +34-96-386-46-68.

E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).

to be essential in mediating several opioid behavioural and physiological effects, since the blockade of these receptors inhibit the development of morphine tolerance and physical dependence but not its expression [78–80]. However, other reports have demonstrated that NMDA antagonists failed to block the development of morphine tolerance [14]. They have also been shown to prevent morphine-induced CPP in mice and rats [18,35,61,81,82], the expression of aggressive behaviour in withdrawn morphine-dependent mice [75] and the acquisition of intravenous morphine self-administration in mice [70]. On the other hand, NMDA receptor antagonists injected in the NAcc had no effects on heroin self-administration in rats [62] and other behavioural changes, such as induction of motor sensitisation induced by repeated opiate exposure, appeared to be unaffected by NMDA receptor blockade [64].

After discontinuation of opioid consumption, addicted individuals experience withdrawal characterised by a dysphoric, anxious state accompanied by unpleasant peripheral disturbances, which underline a psychic and physical dependence induced by opioid exposure. Withdrawal is a phenomenon that contributes to continuing drug self-administration even if it is not the cause of relapse, since many years after detoxification relapse can appear. Therefore, drugs that block the development as well the expression of opioid dependence could be useful in detoxifying opioid addicts. The animal model most frequently used to test the motivational aspects of morphine withdrawal is naloxone-induced conditioned place aversion (CPA). This model employs a classical Pavlovian conditioning because animals avoid environmental stimuli previously paired with negative reinforcers such as naloxone (place aversion). Most studies using CPP and CPA test animals in a drug-free state to avoid effects on behavioural performance. Testing animals in an undrugged state could be a disadvantage, since conditioning and testing are conducted in two different interoceptive states causing a risk of a false negative.

In this work, we investigated the effect of two non-competitive NMDA antagonists, memantine and MK-801, on the acquisition and expression of naloxone-induced place aversion in morphine-dependent mice. The tests were performed under the effect of morphine as during the days of conditioning and development of dependence. MK-801 has been shown to block naloxone-induced CPA in rats [31] but only one report tests rats under the effect of morphine [82]. Memantine has also been shown to block naloxone-induced CPA in rats [61] but not in mice [7]. Moreover, the effect of MK-801 and memantine on the expression of naloxone-precipitated physical syndrome in morphine-dependent mice was studied, measuring several behavioural and physiological parameters. To test the hypothesis that NMDA antagonists could block the development of dependence and that this effect could be due to a state-dependent learning, naloxone-induced place aversion and physical syndrome were investigated in mice receiving morphine plus MK-801 or memantine during development and maintenance of

morphine dependence including days in which behaviours (place aversion and physical syndrome) were measured.

2. Material and methods

2.1. 1st experiment: conditioned place aversion

2.1.1. Subjects

In this first study, 203 albino male mice of the OF1 strain, acquired commercially in Charles River (Barcelona) were used. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of five, in transparent plastic cages (22 cm × 38 cm), for an adaptation time of 10 days, under the following conditions: constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), a reversed light schedule (white lights on 19:30–07:30 h), and food and water available ad libitum, except during the behavioural test. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.1.2. Apparatus

Four identical Plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm long × 31.5 cm wide × 34.5 cm high) separated by a gray central area (13.8 cm long × 31.5 cm wide × 34.5 cm high) were used. The compartments had different coloured walls (black versus white) and also distinct floor textures (fine grid in the white compartment and wide grid in the black one).

2.1.3. Drugs

Morphine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber, Toledo, Spain), naloxone hydrochloride (Laboratorios Abelló, Madrid, Spain), MK-801 (Research Biochemical International, Natick, USA), memantine (Laboratorios Sigma–Aldrich Química, Madrid, Spain) and physiological saline (NaCl 0.9%) were used in these experiments. Drugs were diluted in physiological saline (0.1 mg/ml), and administered i.p., the injection volume being proportional to the weight of the mouse (1 ml of dissolution per 100 g of weight).

2.1.4. Doses

To induce morphine dependence, a treatment with increasing morphine doses (6, 12, 25, 50 and 100 mg/kg) every 24 h was administered to all groups. The highest dose (100 mg/kg) was achieved the fifth day and was maintained during the conditioning procedure (9 days). In the groups in which dependence was induced with a blockade of NMDA receptors, animals received the same treatment with morphine but in addition, a daily injection of memantine (5 and 10 mg/kg) or MK-801 (0.1, 0.05, 0.025 mg/kg) was administered. Naloxone was used at the dose of 0.25 mg/kg. All the drugs were dissolved in physiological serum (NaCl 0.9%), the volume of injected drug being constant (10 ml/kg).

2.1.5. Procedure

The experiment consisted of three phases. During the first phase (pre-conditioning), mice were given access to both compartments of the apparatus for 1200 s (20 min), the time spent by the animal in each compartment being recorded. Animals showing strong unconditioned aversion (less than 300 s) or preference (more than 900 s) for any compartment were discarded. One compartment was chosen to be paired with naloxone and the other with vehicle, taking into account that in each group half of the animals received the treatment in the most preferred compartment and the other half in the least preferred. After assigning the compartments, there were no significant differences between time spent in the naloxone-paired and the vehicle-paired compartments during the preconditioning phase. This is an important step in the experimental procedure that avoids any preference bias before conditioning.

In the second phase (conditioning), which had a duration of 6 days, the animals received an injection of physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 20 min, and after an interval of 24 h, they received naloxone immediately before confinement (30 min before MK-801 or memantine, in the appropriate groups) in the naloxone-paired compartment for 20 min (M-Nal, M-Mem and M-MK groups). In five groups, animals were injected with MK-801 (0.3, 0.1 and 0.05 mg/kg) or memantine (10 and 5 mg/kg) 30 min before receiving naloxone to verify whether these drugs are able to block the aversion induced by naloxone during the conditioning phase (acquisition groups: Mem5 acq, Mem10 acq, MK0.3 acq, MK0.1 acq, MK0.05 acq). For animals in which morphine was co-administered with a NMDA antagonist during the induction of dependence, a similar procedure was used (MMem10-Nal, MMem5-Nal, MMK0.1-Nal, MMK0.05-Nal, MMK0.025-Nal).

During the third phase (post-conditioning), the guillotine door separating the two compartments was removed and the time spent by the untreated mice in each compartment was recorded for 1200 s of observation. In addition to the groups previously mentioned, in another eight groups the animals received MK-801 (0.3, 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 and 0.006 mg/kg) or memantine (10 and 5 mg/kg) 30 min before the test session to determine whether these drugs are able to block the conditioned aversion induced by naloxone (expression groups: Mem5 exp, Mem10 exp, MK0.3 exp, MK0.1 exp, MK0.05 exp, MK0.025 exp, MK0.012 exp, MK0.006 exp). Time spent in the central area in pre- and post-conditioning sessions was proportionally divided between both conditioning compartments by means of the application of a factor of correction, which resulted from the division of the total time (1200 s) between the sum of the time spent in each conditioning compartment (factor of correction = $1200 / [(time\ spent\ in\ naloxone\ paired\ compartment) + (time\ spent\ in\ vehicle\ paired\ compartment)]$). Afterwards, the time spent in each compartment was multiplied by this factor of correction. The application of this correc-

tor makes it possible to take into account the time spent in the central area and facilitates the statistical analysis of data and the representation of the results.

The difference in seconds between the time spent in the naloxone-paired compartment in the post-conditioning test and that spent in the pre-conditioning one is a measure of the degree of aversion induced by naloxone. If this difference does not exist, it means that the treatment has blocked naloxone-induced CPA, while the opposite indicates the treatment cannot block this aversion.

2.1.6. Statistical analysis

A Kruskal–Wallis (KW) test with the data obtained during the pre-conditioning phase in each of the groups was made. Additionally, the Wilcoxon test was performed with the data obtained during the pre- and post-conditioning phase in each group.

2.1.7. Results

The results indicate that there were no differences between the groups in the pre-conditioning phase (KW, $P < 0.999$). The results obtained with the Wilcoxon test in each group between the time spent in the naloxone-paired compartment in the pre- and post-conditioning phase reveal that in the control group significant differences exist ($P < 0.007$) showing the naloxone-induced CPA. These differences were also present in the groups which received morphine plus 5 mg/kg of memantine (MMem5-V-Nal, $P < 0.007$) or morphine plus 0.025 mg/kg of MK-801 (MMK0.025-V-Nal, $P < 0.005$) during the induction of dependence (see Fig. 1).

When memantine or MK-801 were administered in the acquisition phase of the conditioning, CPA was only observed after 5 mg/kg of memantine (Mem5 acq, $P < 0.02$) or 0.05 mg/kg of MK-801 (MK0.05 acq, $P < 0.009$) (see Fig. 2).

On the other hand, MK-801 administration blocked the expression of CPA with all of the administered doses (see Fig. 3). When memantine was administered during the expression of the conditioning, CPA was observed after the dose of 5 mg/kg (Mem5 exp, $P < 0.01$).

2.2. 2nd experiment: physical syndrome of morphine withdrawal

2.2.1. Subjects

Two hundred and fourteen albino male mice of the OF1 strain, acquired commercially in CRIFFA (Barcelona) were used in this second study. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups under the same conditions as mentioned in the first experiment. The same drugs were also used.

2.2.2. Doses

The induction program of morphine dependence lasted for 11 days, with increasing doses of morphine (6, 12, 25, 50 and 100 mg/kg every 24 h) injected for 5 days until

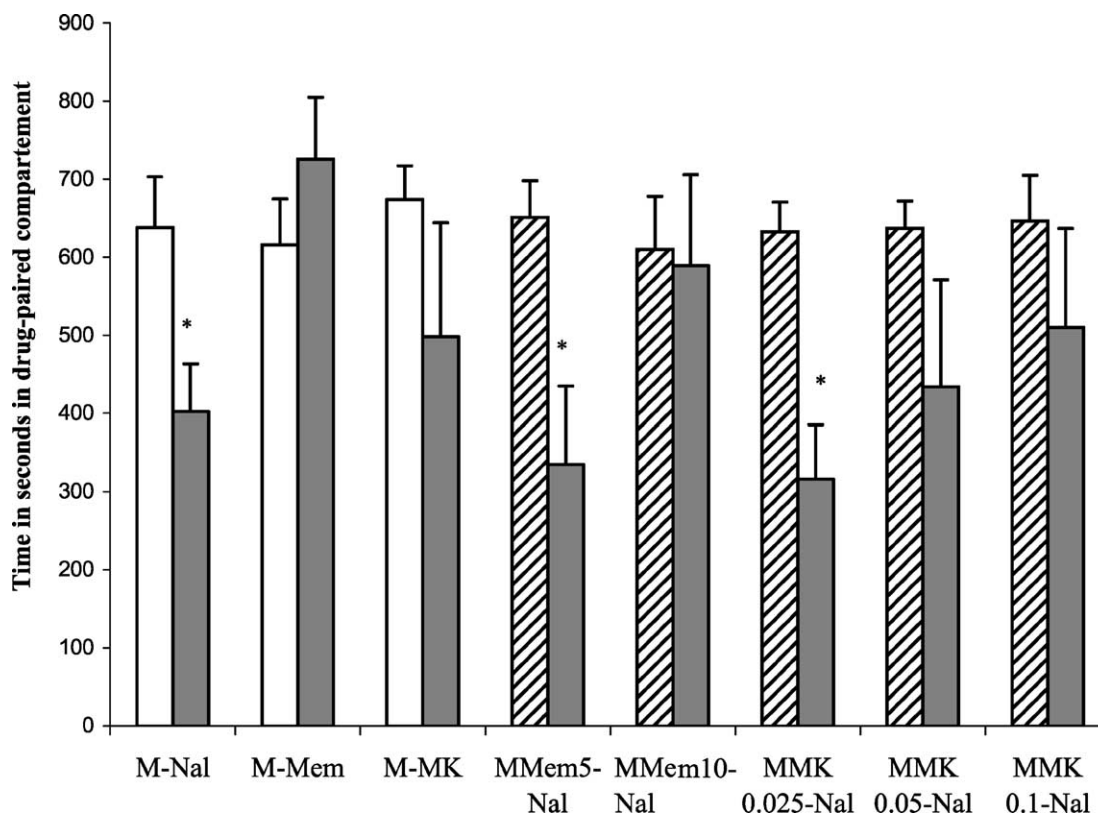


Fig. 1. Effect of naloxone and NMDA antagonists on conditioned place aversion. During the phase of conditioning, animals were divided into the following groups: morphine-dependent animals which received saline in one compartment and 1 mg/kg of naloxone (**M-Nal**), 10 mg/kg of memantine (**M-Mem**) or 0.3 mg/kg of MK-801 (**M-MK**) in the other compartment; and animals in which morphine was co-administered jointly with a NMDA antagonist during the induction of dependence and received during the conditioning saline in one compartment and 1 mg/kg of naloxone in the other (**MMem10-Nal**, **MMem5-Nal**, **MMK0.1-Nal**, **MMK0.05-Nal**, **MMK0.025-Nal**). The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars for animals with morphine dependence and dashed bars for animals with morphine plus NMDA antagonist dependence) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars). (*) $P < 0.007$, significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning vs. post-conditioning tests.

arriving at the highest dose (100 mg/kg), which was maintained for 6 days more. Appropriate control groups received physiological saline for 11 days. To induce morphine withdrawal, naloxone was injected at the dose of 1 mg/kg on the test day (V-V-V, V-V-Nal, M-V-V, M-V-Nal groups). With the aim of evaluating the effect of the blockade of NMDA receptors in dependent animals, in another five additional groups after the induction of morphine dependence, different doses of memantine or MK-801 were injected 30 min before the test (M-Mem5-V, M-Mem10-V, M-MK0.1-V, M-MK0.05-V, M-MK0.025-V groups). In five more groups, the same drugs were administered before the naloxone injection (M-Mem5-Nal, M-Mem10-Nal, M-MK0.1-Nal, M-MK0.05-Nal, M-MK0.025-Nal groups), these groups showing the effect of NMDA receptor blockade in the intensity of the physical withdrawal syndrome. Finally, in five more groups, morphine dependence was induced under the blockade of NMDA receptors, i.e. the different morphine doses were injected at the same time as memantine or MK-801 (MMem5-V-Nal, MMem10-V-Nal, MMK0.1-V-Nal, MMK0.05-V-Nal, MMK0.025-V-Nal groups). All the drugs were dissolved in physiological

serum (NaCl 0.9%), the volume of injected drug (10 ml/kg) being constant.

2.2.3. Procedure

On the day of the test, all experimental groups received three injections depending on the treatment: first, morphine or physiological saline 60 min before the test; second, memantine, MK-801 or physiological saline 30 min before the test; and finally, naloxone or physiological saline immediately before the behavioural test. Morphine, MK-801 and memantine administration took place in the animal room, naloxone being administered in the experimental room.

The animals were weighed the day on which the behavioural test took place, and afterwards, the corresponding dose of saline or morphine was injected. Memantine, MK-801 or physiological saline was injected 30 min later. Immediately before the test, animals were injected with naloxone or physiological saline (according to the experimental group) and behaviour was video-recorded during the following 20 min using white light. Forty minutes after the end of the test (1 h after naloxone or physiological saline injection), animals were weighed again.

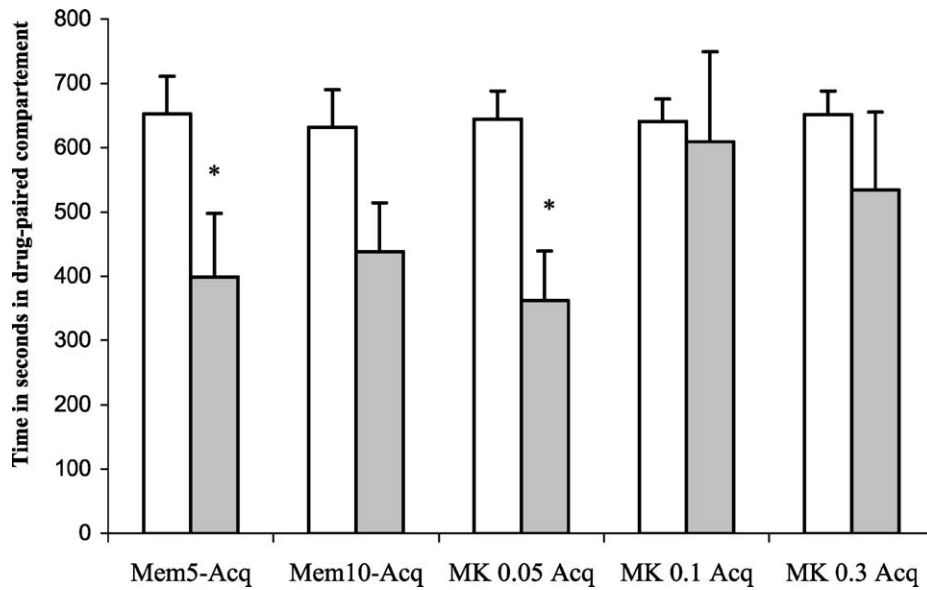


Fig. 2. Effect of NMDA antagonists on the acquisition of conditioned place aversion. During the phase of conditioning, morphine-dependent animals received saline in one compartment and 1 mg/kg of naloxone plus 5 or 10 mg/kg of memantine (**Mem5 acq** and **Mem10 acq**) or plus 0.3, 0.1 or 0.05 mg/kg of MK-801 (**MK0.3 acq**, **MK0.1 acq** and **MK0.05 acq**) in the other. The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars). (*) $P < 0.009$, significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning vs. post-conditioning tests.

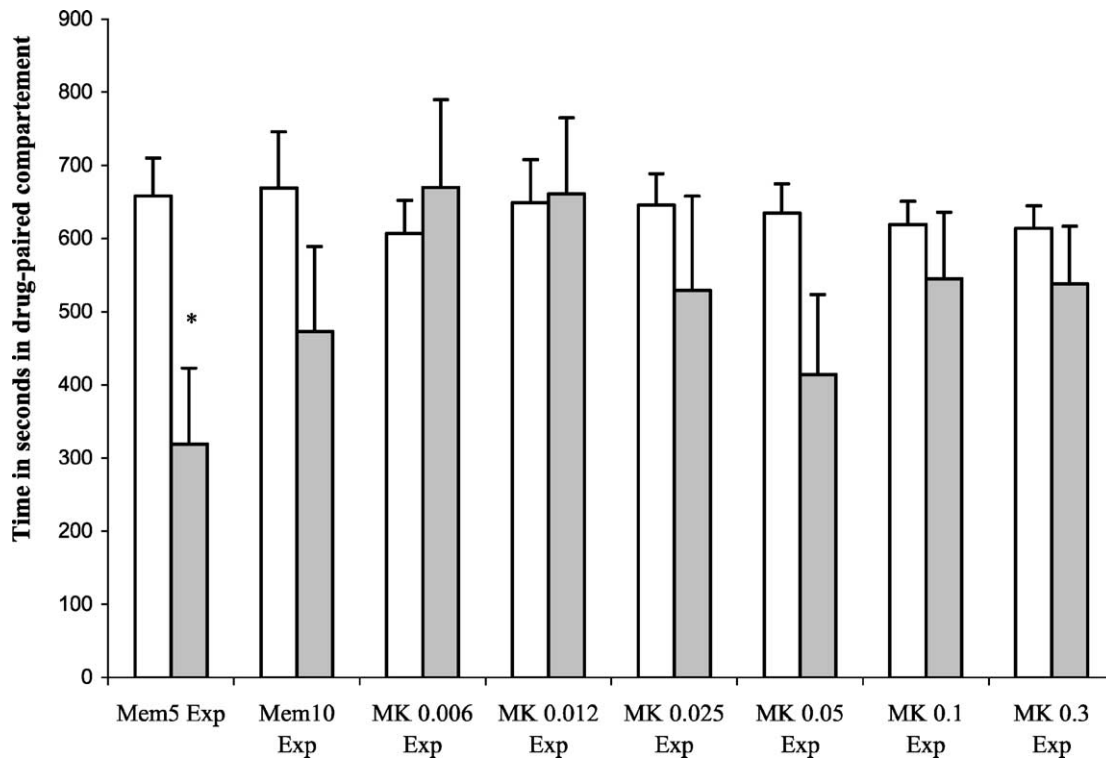


Fig. 3. Effect of NMDA antagonists on the expression of conditioned place aversion. Thirty minutes before the test, morphine-dependent animals conditioned with saline in one compartment and 1 mg/kg of naloxone in the other, received 5 or 10 mg/kg of memantine (**Mem5 exp** and **Mem10 exp**) or 0.3, 0.1 or 0.05 mg/kg of MK-801 (**MK0.3 exp**, **MK0.1 exp** and **MK0.05 exp**). The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars). (*) $P < 0.01$, significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning vs. post-conditioning tests.

2.2.4. Behavioural analysis

The experimenter, blind as to animal treatments, evaluated the videotapes to assess behavioural patterns using a micro-processor (PC computer) and a modified custom-developed program [10] that allowed estimation of times allocated to different behaviours. The evaluated behaviours, based on the description of Fernandez-Espejo et al. [21] were the following: paw tremor, body shakes or “wet-dog shakes”, genital grooming, ptosis, and diarrhoea. The frequency of paw tremor, body shakes, and jumping, and the time spent in genital grooming were evaluated. Ptosis and diarrhoea were checked for their presence. In addition to these behaviours, percentage of weight loss was measured.

Furthermore, a score for each group was calculated using a modification of the scale described by Gellert and Holtzman [23], in which two classes of signs were distinguished. Graded signs were considered as: weight loss (each 1% of weight loss quantified as 1); number of jumps (1–4 quantified as 1, 5–9 quantified as 2, and >10 quantified as 3); number of body shakes (1–2 quantified as 2, >3 quantified as 4). Checked signs, in which only the presence or absence was evaluated, were considered as: diarrhoea [2], ptosis [2], abnormal posture [3], and erection or ejaculation (genital grooming) [3]. For more details see Broseta et al. [12].

2.2.5. Statistical analyses

Nonparametric statistics were performed for all behavioural patterns. KW tests were used to assess the variance of the behavioural measures over groups using the medians for times allocated to each behavioural category. The two-tailed Mann–Whitney *U*-test then examined the differences between the experimental groups. Data concerning the

Gellert–Holtzman scale were analysed by an analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons (Newman–Keuls) were subsequently carried out to ascertain pair-wise differences between means.

3. Results

3.1. Jumping

Jumping (see Table 1) was observed only in a few groups (KW, $P < 0.001$). Dependent animals which received only naloxone (M-V-Nal) presented a significant increase in the incidence of jumping with respect to controls (V-V-V and V-V-Nal, $P < 0.02$), morphine-dependent animals which did not receive naloxone (M-V-V, M-Mem5-V, M-Mem10-V, M-MK0.1-V, M-MK0.05-V and M-MK0.025-V; $P < 0.02$ in all cases), and groups which received the highest mepanidine dose in acute or chronic administration (M-Mem10-Nal and M-Mem10-V-Nal, $P < 0.02$) or different MK-801 doses (MMK0.025-V, MMK0.1-V-Nal, MMK0.05-V-Nal and MMK0.025-V-Nal; $P < 0.02$).

3.2. Wet dog shakes

Wet dog shakes (see Table 1) were not observed either following saline or naloxone injections in all saline-treated groups, or following saline injection in morphine-treated groups. Naloxone administration-induced body shakes in all morphine-treated animals (KW, $P < 0.001$) except in M-Mem10-V-Nal and MMK0.1-V-Nal. Thus, the M-V-Nal group showed a significant increase in the number of body shakes with respect to the rest of the groups (Mann–Whitney

Table 1

Median values with percentile range of the incidence of jumping, body shakes and paw tremor

	Jumping	Body shakes	Paw tremor	Gellert–Holtzman scale
V-V-V	0* (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–0)	4.5 (±0.5)**
V-V-Nal	0** (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–1)	7 (±0.6)**
M-V-V	0** (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–0)	2.9 (±0.2)**
M-V-Nal	2 (0–7.2)	3.5 (1.5–7)	126 (77–137)	13.4 (±1.8)
M-Mem5-V	0** (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–0)	3.1 (±0.1)**
M-Mem10-V	0** (0–0)	0*** (0–1)	7*** (5–9)	3.2 (±0.4)**
M-MK0.025-V	0** (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–0)	3.9 (±0.8)**
M-MK0.05-V	0** (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–0)	2.2 (±0.5)**
M-MK0.1-V	0** (0–0)	0*** (0–0)	0*** (0–0)	2.8 (±0.5)**
M-Mem5-Nal	17 (7–58)	4 (2.5–7)	107 (102–180)	10.7 (±1.6)
M-Mem10-Nal	0** (0–0)	0.5*** (0–1.7)	17*** (4–46)	6.8 (±1)**
M-MK0.025-Nal	0** (0–0)	2 (1.2–2)	18*** (10–48)	10.6 (±1.2)
M-MK0.05-Nal	0** (0–0)	1* (0.2–1)	16*** (3–22)	9.3 (±1.4)
M-MK0.1-Nal	0 (0–29)	2.5 (1–5)	7*** (3–20)	11 (±1.1)**
MMem5-V-Nal	1 (0–12.7)	4.5 (1.2–5)	38** (24–86)	11.4 (±1.2)
MMem10-V-Nal	0** (0–0)	0*** (0–1)	25** (3–59)	5.9 (±0.9)**
MMK0.1-V-Nal	0** (0–0)	0*** (0–0)	4*** (0–9)	7.4 (±1.2)**
MMK0.05-V-Nal	0** (0–0)	1*** (0–1)	10*** (3–22)	9.4 (±1.4)
MMK0.025-V-Nal	12.5 (0–33.5)	3 (1.2–4)	20*** (7–39)	13.3 (±1.2)

Mann–Whitney *U*-test: differs from M-V-Nal, (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.02$, (***) $P < 0.002$. Means (±S.E.M.) of Gellert–Holtzman score. Newman–Keuls test: differs from M-V-Nal, (***) $P < 0.01$.

U-test, $P < 0.05$ for M-MK0.025-Nal and $P < 0.002$ for the other groups).

3.3. Paw tremor

As with the wet dog shakes, paw tremor (see Table 1) was not observed either following saline or naloxone injection in all saline-treated groups, or following saline injection in morphine-treated groups. Conversely, this behaviour was observed after naloxone administration in all morphine-treated animals (KW, $P < 0.001$). Morphine-dependent animals which only received naloxone (M-V-Nal) presented an increase in this behaviour in comparison with the rest of the groups (Mann–Whitney *U*-test $P < 0.02$ for MMem5-V-Nal and MMem10-V-Nal and $P < 0.002$ for the other groups) with the exception of M-Mem5-Nal animals.

3.4. Gellert–Holtzman scale

Results obtained with the Gellert–Holtzman scale are represented in Table 1. The ANOVA showed that the variable treatment was significant [$F(18, 157) = 11.884$; $P < 0.0001$]. A post-hoc comparison with the Newman–Keuls method indicated that naloxone administration to morphine-dependent mice (M-V-Nal) produced a significant increase in the score of this scale with respect to control groups (V-V-V and V-V-Nal), morphine-dependent mice which did not receive naloxone (M-V-V, M-Mem5-V, M-Mem10-V, M-MK0.1-V, M-MK0.05-V and M-MK0.025-V), those dependent animals which received naloxone after a sole injection of the highest memantine dose (M-Mem10-Nal) and those which developed morphine dependence along with the co-administration of the highest memantine or MK-801 doses (MMem5-V-Nal and MMem0.01-V-Nal; $P < 0.01$ in all cases).

4. Discussion

The present study found as principal results that both NMDA receptor antagonists, memantine and MK-801, are capable of blocking morphine-withdrawal-induced CPA. On the contrary, differences between these drugs were observed in relation to their capacity of diminishing the intensity of physical signs of morphine withdrawal. Memantine consistently reduces the incidence of jumping, paw tremor or body shakes and the total Gellert–Holtzman scale score. On the other hand, although MK-801 decreases jumping, it produces a less consistent action in other behavioural measures. In addition, our study analyses the effect of a chronic blockade of the NMDA receptors during the development of morphine dependence. Decreases in the intensity of the dependence are observed with the two drugs employed, as CPA is not established and physical signs of withdrawal are less evident.

Neither of the NMDA receptor antagonists used in this study produced any motivational actions in morphine-dependent mice, as conditioning with these drugs did not induce either preference or aversion. Using this paradigm, we have previously observed that a wide range of doses of MK-801 or memantine did not affect preference of naive animals (unpublished data). In the same line as our reports, memantine has been previously shown to have no motivational properties [40,61], but this is not the case for MK-801, very inconsistent results having been reported for this substance [83]. The failure of these NMDA antagonists to produce CPP might be somewhat surprising considering the fact that these drugs can enhance dopaminergic neurotransmission [73] although differences exist in the potency of MK-801 and memantine to induce dopamine release or to increase its metabolism [17].

Once that naloxone-induced CPA is established in morphine-dependent animals, memantine or MK-801 administration has been shown to be capable of blocking either the acquisition or the expression of this CPA. In the acquisition trials, memantine or MK-801 was administered 30 min before the naloxone injection, animals thus being conditioned under the effect of the NMDA antagonists. However, to test the role of these antagonists in the expression of CPA, conditioning was acquired under standard conditions, and the drugs were administered prior to the test session. The highest memantine dose used (10 mg/kg) completely abolished the acquisition as well as the expression of naloxone-induced CPA. Popik and Danysz [61] found similar results using memantine, and in addition, it has been demonstrated that chronic memantine administration did not produce this effect through learning impairment [30,61] or attenuation of the morphine interoceptive cue [61]. On the contrary, Blokhina et al. [7], found no effect of memantine on CPA with naloxone. The schedule of drug administration and the fact that the experimental procedure was substantially different to that employed in our laboratory, e.g. the test session was performed without previous morphine administration, may explain these discrepancies. In a recent experiment (submitted), we have also observed that memantine efficiently counteracted morphine-induced CPP, although this action was achieved at higher doses (20 and 40 mg/kg). Thus, taken together, these results confirm the important value of memantine in the treatment of reward- and aversive-related effects of morphine dependence.

With respect to MK-801, this drug was capable of blocking either the acquisition or expression of naloxone-induced CPA. The action seems to be more potent in the expression, since only the highest doses (0.3 and 0.1 mg/kg) were able to inhibit acquisition of aversion, but all of the doses used, even 0.006 mg/kg dramatically inhibited expression of CPA. In the same line, Watanabe et al., [85] found that a microinjection of MK-801 into the bilateral central nucleus of the amygdala, significantly attenuated the naloxone-precipitated morphine-withdrawal-induced CPA. Our results are in agreement with previous findings showing that MK-801

blocks morphine-induced CPP [18,35,81,82]. It has to be pointed out that in radial maze learning experiments, it has been demonstrated that MK-801, contrary to memantine, has disruptive effects on learning [87]. With respect to the motivational aspect of morphine withdrawal, both NMDA antagonists have shown to be capable of blocking the establishment of CPA. As the dopaminergic system seems to play an important role in the rewarding and aversive states associated with morphine dependence, interaction between glutamatergic and dopaminergic systems is a potential basis of the inhibitory effects of memantine and MK-801 on morphine-induced CPA.

Administration of opiate antagonists to morphine-dependent animals produces a withdrawal syndrome that includes behavioural indices, reflecting a robust aversive state that can be evaluated by CPA and a number of signs and measures of somatic indices dissociated from the motivational aspect [32]. In this study, morphine-dependent mice, after administration of a high naloxone dose (1 mg/kg) developed a clear physical syndrome of withdrawal, as indicated by the behavioural changes produced in the M-V-Nal group.

Contrary to the results obtained in the first experiment studying the motivational aspects of morphine withdrawal, both NMDA antagonists present different effects in the expression of the physical withdrawal syndrome. Administration of 10 mg/kg of memantine 30 min before the naloxone injection prevented the appearance of physical behaviours and signs characteristic of the morphine-withdrawal syndrome. Animals belonging to M-Mem10-Nal presented a similar score in the modified Gellert–Holtzman scale to controls (V-V-V). Similar results were observed in jumping, body shakes or paw tremor. However, MK-801 was not capable of blocking the physical syndrome at any of the doses studied when administered 30 min before naloxone to morphine-dependent animals. Although jumping was abolished, body shakes and paw tremor were not affected by this NMDA antagonist. Moreover, the Gellert–Holtzman score was similar to that observed in those animals which only received naloxone.

Converging lines of evidence indicate that NMDA receptor antagonists are effective in inhibiting the physical aspects of expression of morphine dependence [13,60,65,76,78]. Such effects have also been demonstrated recently for memantine at doses expected to primarily affect NMDA receptors [59]. Although the results of numerous studies that have evaluated the interaction between the NMDA receptor system and physical dependence on opioid-dependent humans have been non-conclusive, a recent report of Bisaga et al. [6] showed that pre-treatment with a single memantine administration attenuated the expression of opioid withdrawal precipitated by naloxone in opioid-dependent individuals maintained on morphine.

The effects of MK-801 on opioid withdrawal are not well defined. Similarly to our results, Watanabe and colleagues [85] found that a microinjection of MK-801 into the bilateral central nucleus of the amygdala significantly attenuates the

naloxone-precipitated morphine-withdrawal-induced CPA, but not the characteristic somatic signs. Although in some studies, the evidence suggests that MK-801 significantly inhibits morphine-withdrawal symptoms in laboratory animals, such as guinea pigs or rats [11,42,65,76,78] and in humans [41,67], the effect of this drug on mice is more controversial. Some authors [25,76,77] have demonstrated inhibition of morphine withdrawal, while others [50,51] have failed to obtain significant effects, suggesting that the effect of MK-801 may depend on the intensity of the withdrawal response and/or the dose of naloxone used.

In addition to these previous results, in our experiments we have demonstrated that memantine and MK-801 are capable of interfering with the normal development of morphine dependence. Administration of morphine plus the higher doses of memantine or MK-801 prevent the development of CPA and decrease the intensity of the physical withdrawal syndrome in these animals after a naloxone injection. Mice which received morphine plus 10 mg/kg of memantine during the development of opiate dependence, did not express CPA after a naloxone injection. In addition, this co-administration efficiently decreased the score of the modified Gellert–Holtzman scale to control levels. A lower memantine dose (5 mg/kg) was insufficient to affect morphine dependence. Furthermore, the higher MK-801 doses (0.1 and 0.05 mg/kg) and morphine co-administration led to the non-development of CPA after naloxone injection. To reduce the intensity of the physical withdrawal syndrome, it was necessary to administer the highest (0.1 mg/kg) MK-801 dose.

Neither is there an agreement with respect to the effect of MK-801 when administered jointly with morphine. In accordance with our results, several authors obtained an attenuation in naloxone-precipitated withdrawal syndrome [47,52], although in some cases they observed the appearance of flaccidity after naloxone injection, which could confound the appearance of physical symptoms [47]. Conversely, other authors have failed to find effects when MK-801 was administered jointly with morphine [26], since there were no changes in EEG or behavioural responses observed after naloxone injection in animals made dependent jointly with MK-801 compared with those which received only morphine. In the same line as these latter authors, Koyuncuoglu and Ariocioglu [43] found an increase in the intensity of physical morphine withdrawal in rats which were rendered morphine-dependent just after the discontinuation of treatment with different NMDA antagonists.

Changes in NMDA receptor expression as a consequence of continuous NMDA receptor blockade have also been described. Chronic administration of MK-801 results in a reduction in the density of the glutamate binding site of the NMDA receptor [4,46]. In addition, chronic treatment with NMDA receptor antagonists seems to influence the function of dopamine D2 receptors [44,53], although there are discrepant results [30]. Studying the expression of physical morphine-withdrawal syndrome, Trujillo [79] suggests that

if NMDA receptors mediate the neural and behavioural plasticity responsible for tolerance and dependence, they should inhibit the development (i.e. acquisition) but not the expression of these phenomena. That is, they should be effective when co-administered with opioids as dependence is acquired, but should be ineffective when administered acutely to dependent subjects. Our results are in agreement with this latter statement only for MK-801. When this NMDA antagonist is co-administered with morphine during the development of dependence it can block the physical manifestation of withdrawal, this effect not being found after acute administration. For memantine the results are quite different, since either co-administration or an acute single administration would be of equal efficacy in blocking morphine-withdrawal symptoms.

Memantine and MK-801 are both non-competitive NMDA receptor antagonists that bind to the PCP-binding site inside the receptor-associated ion channel [8,36,38]. Although the mechanism of action for both drugs is similar, the ion channel is blocked in a use-dependent form only when it is in its open, active state [22,34], however, there are a number of differences in the way the two drugs interact with the NMDA receptor complex. Probably the most important differences are the receptor binding kinetics of the two drugs. While MK-801 binding exhibits slow blocking and unblocking kinetics and little voltage-dependency, memantine binding has fast blocking and unblocking kinetics and strong voltage-dependency [56,57]. Taken together, these findings suggest that due to their binding properties and, in particular, their kinetics, substances like MK-801 might be expected to have a higher propensity than memantine to interfere not only with tonic glutamatergic activity but also with phasic NMDA receptor activity, which may account for the markedly different profile of effects and side effects [39]. These differences are also found at the behavioural level. Although both drugs produce similar actions, such as an increase in locomotor activity [16], in other fields discrepancies are observed, since contrary to memantine for example, MK-801 is self-administered [3] and has been demonstrated to potentiate brain stimulation reward [15,28,84].

It might be hypothesised that the poor overall outcome of pharmacological treatments, of opioid abuse, e.g. clonidine, is caused by the fact that these drugs fail to affect the motivational aspects of opioid withdrawal syndrome. Therefore, pharmacological manipulations that would diminish the motivational aspects of opioid withdrawal may be considered as more beneficial treatments of opioid dependence. Such inhibitory effects, as demonstrated in CPA procedure, have been shown for MK-801 and for memantine in the present study. The fact that MK-801 exerts little effect on the relief of physical withdrawal signs and, in addition, presents appreciable side-effects, makes memantine a drug of choice in the treatment of opiate addicts.

In conclusion, the results suggest that NMDA receptors are necessary for the establishment of either place aversion or physical syndrome. In other words, NMDA receptors are

involved in motivational and physical signs of morphine withdrawal. The NMDA receptor antagonists memantine and MK-801 present a different behavioural profile with respect to morphine withdrawal. Memantine blocks both aspects of withdrawal, but MK-801 is more effective blocking CPA, being ineffective in counteracting the physical syndrome. When dependence is developed under the blockade of NMDA receptors, both drugs are capable of inhibiting the two aspects of withdrawal. This could suggest that NMDA receptor function is necessary for the establishment of morphine dependence, as expressed in the reduction or abolition of physical and motivational withdrawal signs.

Acknowledgements

This research was supported by the following grants: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Dirección General de Investigación and FEDER (Ref BSO2002-00106); Instituto de Salud “Carlos III” (FIS), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (G03/005); and Dirección General de Drogodependencias (Proyecto de Investigación en materia de drogodependencias y otras adicciones, 2002), Conselleria de Bienestar Social, Generalitat Valenciana, Spain. We wish to thank Ms. Miriam Phillips for the English revision of the manuscript.

References

- [1] Acquas E, Carboni E, Leone P, Di Chiara G. SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine-receptor blockade. *Psychopharmacology* 1989;99:151–5.
- [2] Bardo MT. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* 1998;12:37–67.
- [3] Beardsley PM, Hayes BA, Balster RL. The self-administration of MK-801 can depend upon drug-reinforcement history, and its discriminative stimulus properties are phencyclidine-like in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;252:953–9.
- [4] Beart PM, Lodge D. Chronic administration of MK-801 and the NMDA receptor: further evidence for reduced sensitivity of the primary acceptor site from studies with the cortical wedge preparation. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:354–5.
- [5] Beninger RJ, Miller R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;22:335–45.
- [6] Bisaga A, Comer SD, Ward AS, Popik P, Kleber HD, Fischman MW. The NMDA antagonist memantine attenuates the expression of opioid physical dependence in humans. *Psychopharmacology* 2001;157:1–10.
- [7] Blokhina EA, Sukhotina IA, Bepalov AY. Pretreatment with morphine potentiates naloxone-conditioned place aversion in mice: effects of NMDA receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2000;406:227–32.
- [8] Bormann J. Memantine is a potent blocker of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol* 1989;166:591–2.
- [9] Bozarth MA, Wise RA. Heroin reward is dependent on a dopaminergic substrate. *Life Sci* 1981;29:1881–6.
- [10] Brain PF, McAllister KH, Wamsley SV. Drug effects on social behaviors. In: Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ, editors. *Methods*

- in ethopharmacology. *Psychopharmacology* (series: Neuromethods, vol. 13). Clifton, NJ: Human Press; 1989. p. 687–739.
- [11] Brent PJ, Chahl LA. Enhancement of the opiate withdrawal response by antipsychotic drugs in guinea-pigs is not mediated by sigma bindings sites. *Eur Neuropsychopharmacol* 1993;3:23–32.
- [12] Broseta I, Rodríguez-Arias M, Stinus L, Miñarro J. Ethological analysis of morphine withdrawal with different dependence programs in male mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26(2):335–47.
- [13] Cappendijk SL, de Vries R, Dzoljic MR. Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 1993;3: 111–6.
- [14] Carlezon WA, Kosten TA, Nestler EJ. Behavioral interactions caused by combined administration of morphine and MK 801 in rats. *Psychopharmacology* 2000;151:261–72.
- [15] Corbett D. Possible abuse potential of the NMDA antagonist MK-801. *Behav Brain Res* 1989;34:239–46.
- [16] Danysz W, Essmann U, Bresink I, Rolf W. Glutamate antagonists have different effects on spontaneous locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48:111–8.
- [17] Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. Amino-adamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents—preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:455–68.
- [18] Del Pozo E, Barrios M, Baeyens JM. The NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) stereoselectively inhibits morphine-induced place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology* 1996;125:209–13.
- [19] Di Chiara G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 1995;38:95–137.
- [20] Ettenberg A, MacConell LA, Geist TD. Effects of haloperidol in a response-reinstatement model of heroin relapse. *Psychopharmacology* 1996;124:205–10.
- [21] Fernandez-Espejo E, Cador M, Stinus L. Ethopharmacological analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rats: a newly-developed “etho-score”. *Psychopharmacology* 1995;122:122–30.
- [22] Foster AC, Wong WHF. The novel anticonvulsant (+)-MK-801 binds to the activated state of the *N*-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 1987;91:403–9.
- [23] Gellert VF, Holtzman SG. Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* 1978;205:536–46.
- [24] Glick SD, Cox RD. Dopaminergic and cholinergic influences on morphine self-administration in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1975;12:17–24.
- [25] Gonzalez P, Cabello P, Germany A, Norris B, Contreras E. Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 1997;332:257–62.
- [26] Haberny KA, Young GA. Interactive effects of MK-801 and morphine on EEG, EEG power spectra and behaviour in rats: II. Morphine dependence. *Eur J Pharmacol* 1994;261:11–6.
- [27] Hand TH, Franklin KB. 6-OHDA lesions of the ventral tegmental area block morphine-induced but not amphetamine-induced facilitation of self-stimulation. *Brain Res* 1985;328:233–41.
- [28] Herberg LJ, Rose IC. The effect of MK-801 and other antagonists of NMDA-type glutamate receptors on brain-stimulation reward. *Psychopharmacology* 1989;99:87–90.
- [29] Herman BH, Vocci F, Bridge P. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. Medication development issues for opiate addiction. *Neuropsychopharmacology* 1995;13:269–93.
- [30] Hesselink MB, Smolders H, De Boer AG, Breimer DD, Danysz W. Modifications of the behavioral profile of non-competitive NMDA receptor antagonists, memantine, amantadine and (+)MK-801 after chronic administration. *Behav Pharmacol* 1999;10:85–98.
- [31] Higgins GA, Nguyen P, Sellers EM. The NMDA antagonist dizocilpine (MK801) attenuates motivational as well as somatic aspects of naloxone precipitated opioid withdrawal. *Life Sci* 1992;50:167–72.
- [32] Higgins GA, Sellers EM. Antagonist-precipitated opioid withdrawal in rats: evidence for dissociations between physical and motivational signs. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48:1–8.
- [33] Hong M, Milne B, Jhamandas K. Evidence for the involvement of excitatory amino acid pathways in the development of precipitated withdrawal from acute and chronic morphine: an in vivo voltammetric study in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 1993;623:131–41.
- [34] Kemp JA, Foster AC, Wong EHF. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 1987;10:294–9.
- [35] Kim HS, Jang CG, Park WK. Inhibition by MK-801 of morphine-induced conditioned place preference and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;55:11–7.
- [36] Kloog Y, Nadler V, Sokolovsky M. Mode of binding of [³H]dibenzocycloalkenimine (MK-801) to the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and its therapeutic implication. *FEBS Lett* 1988;230:167–70.
- [37] Koob GF. Drug of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:177–84.
- [38] Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hubers M, Riederer P. Memantine displaces [³H]-MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1989;166:589–90.
- [39] Kornhuber J, Weller M. Psychotogenicity *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry* 1997;41:135–44.
- [40] Kotlinska J, Biala G. Memantine and ACPC affect conditioned place preference induced by cocaine in rats. *Pol J Pharmacol* 2000;52:179–85.
- [41] Koyuncuoglu H, Saydam B. The treatment of heroin addicts with dextromethorphan: a double-blind comparison of dextromethorphan with chlorpromazine. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1990;28:147–52.
- [42] Koyuncuoglu H, Güngör M, Sagduyu H, Aricioglu F. Suppression by ketamine and dextromethorphan of precipitated abstinence syndrome in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;35:829–32.
- [43] Koyuncuoglu H, Ariocioglu G. Previous chronic blockade of NMDA receptors intensifies morphine dependence in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;39:575–9.
- [44] Lannes B, Bernard V, Bloch B, Micheletti G. Chronic treatment with dizocilpine maleate increases the number of striatal neurons expressing the *d*-2 receptor gene. *Neuroscience* 1995;65:431–8.
- [45] Leone P, Di Chiara G. Blockade of D-1 receptors by SCH 23390 antagonizes morphine- and amphetamine-induced place preference conditioning. *Eur J Pharmacol* 1987;135:251–4.
- [46] Manallack DT, Lodge D, Beart PM. Subchronic administration for MK-801 in the rat decreases cortical binding of [³H]D-AP5, suggesting down-regulation of the cortical *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 1989;30:87–94.
- [47] Manning BH, Mao J, Frenk H, Price DD, Mayer DJ. Continuous co-administration of dextromethorphan or MK-801 with morphine: attenuation of morphine dependence and naloxone-reversible attenuation of morphine tolerance. *Pain* 1996;67:79–88.
- [48] Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Miñarro J. Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 2001;121:189–97.
- [49] Mao J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception. *Brain Res Rev* 1999;30:289–304.
- [50] Marquis KL, Piesla MJ, Muth EA, Boast CA. Effects of acute/chronic MK-801 on naloxone-precipitated jumping in morphine-dependent mice. *Soc Neurosci Abstr* 1991;17:331.
- [51] Matwyshyn GA, Thorat SN, Barjavel M, Gudehithlu KP, Bhargava HN. Comparative effects of MK-801 and *N*^ω-monomethyl-L-arginine

- (NMMA) on morphine abstinence syndrome. Soc Neurosci Abstr 1993;19:1461.
- [52] McLemore G, Kest B, Inturrisi CE. The effects of LY293558, an AMPA receptor antagonist, on acute and chronic morphine dependence. *Brain Res* 1997;778:120–6.
- [53] Micheletti G, Lannes B, Haby C, Borrelli E, Kempf E, Warter JM, et al. Chronic administration of NMDA antagonists induces D2 receptor synthesis in rat striatum. *Mol Brain Res* 1992;14:363–8.
- [54] Nestler EJ. Under siege: the brain on opiates. *Neuron* 1996;16:897–900.
- [55] Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581–618.
- [56] Parsons CG, Panchenko VA, Pinchenko VO, Tsyndrenko Ay, Krishtal OA. Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine. *Eur J Neurosci* 1996;8:446–54.
- [57] Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 1999;38:735–67.
- [58] Phillips AG, Broekkamp CL, Fibiger HC. Strategies for studying the neurochemical substrates of drug reinforcement in rodents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1983;7:585–90.
- [59] Popik P, Skolnick P. The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;53:791–7.
- [60] Popik P, Layer RT, Fossom L, Benveniste M, Getter-Douglas B, Witkin JM, et al. NMDA antagonist properties of the putative anti-addictive drug, ibogaine. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:753–60.
- [61] Popik P, Danysz W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:854–65.
- [62] Pulvirenti L, Maldonado-Lopez R, Koob GF. NMDA receptors in the nucleus accumbens modulate intravenous cocaine but not heroin self-administration in the rat. *Brain Res* 1992;594:327–30.
- [63] Pulvirenti L, Koob GF. Dopamine receptor agonists, partial agonists and psychostimulant addiction. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:374–9.
- [64] Ranaldi R, Munn E, Neklesa T, Wise RA. Morphine and amphetamine sensitisation in rats demonstrated under moderate- and high-dose NMDA receptor blockade with MK-801 (dizocilpine). *Psychopharmacology* 2000;151:192–201.
- [65] Rasmussen K, Fuller RW, Stockton ME, Perry KW, Swinford RM, Ornstein PL. NMDA receptor antagonists suppress behaviours but not norepinephrine turnover or locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. *Eur J Pharmacol* 1991;197:9–16.
- [66] Rasmussen K. The role of the locus coeruleus and *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1995;13:295–300.
- [67] Rosen MI, McMhoh TH, Woods S, Pearsall HR, Kosten TR. The effect of dextromethorphan on naloxone-precipitated opiate withdrawal. In: Paper presented at the NIDA technical review. The role of glutamatergic system in the development of opiate addiction. Gaithersburg, MD, October 17–18; 1995.
- [68] Salamone JD. The behavioral neurochemistry of motivation: methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. *J Neurosci Met* 1996;64:137–49.
- [69] Satoh M, Zieglansberger W, Herz A. Supersensitivity of cortical neurones of the rat to acetylcholine and L-glutamate following chronic morphine treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1976;293:101–3.
- [70] Semenova S, Danysz W, Bepalov A. Low-affinity NMDA receptor channel blockers inhibit acquisition of intravenous morphine self-administration in naive mice. *Eur J Pharmacol* 1999;378:1–8.
- [71] Sepulveda MJ, Hernandez L, Rada P, Tucci S, Contreras E. Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:255–62.
- [72] Shippenberg TS, Bals-Kubik R, Herz A. Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:53–9.
- [73] Spanagel R, Eibacher R, Wilke R. Memantine-induced dopamine release in the prefrontal cortex and striatum of the rat—a pharmacokinetic microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 1994;262:21–6.
- [74] Spyraiki C, Fibiger HC, Phillips AG. Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology* 1983;79:278–83.
- [75] Sukhotina IA, Bepalov AY. Effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and MRZ 2/579 on morphine withdrawal-facilitated aggression in mice. *Psychopharmacology* 2000;149:345–50.
- [76] Tanganelli S, Antonelli T, Morari M, Bianchi C, Beani L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea-pigs. *Neurosci Lett* 1991;122:270–2.
- [77] Thorat SN, Barjavel MJ, Matwyshyn GA, Bhargava HN. Comparative effects of *N*^ω-monomethyl-L-arginine and MK-801 on the abstinence syndrome in morphine-dependent mice. *Brain Res* 1994;642:153–9.
- [78] Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 1991;251:85–7.
- [79] Trujillo KA. Effects of noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists on opiate tolerance and physical dependence. *Neuropsychopharmacology* 1995;13:301–7.
- [80] Trujillo KA. Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioural plasticity? *Psychopharmacology* 2000;151:121.
- [81] Tzschentke TM, Schmidt WJ. *N*-methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neurosci Lett* 1995;193:37–40.
- [82] Tzschentke TM, Schmidt WJ. Interactions of MK-801 and GYKI 52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioral sensitization. *Behav Brain Res* 1997;84:99–107.
- [83] Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 1998;56:613–72.
- [84] Tzschentke TM, Schmidt WJ. Effects of the non-competitive NMDA-receptor antagonist memantine on morphine- and cocaine-induced potentiation of lateral hypothalamic brain stimulation reward. *Psychopharmacology* 2000;149:225–34.
- [85] Watanabe T, Nakagawa T, Ymamaoto R, Maeda A, Minami M, Satoh M. Involvement of glutamate receptors within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Jpn J Pharmacol* 2002;4:399–406.
- [86] Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:243–51.
- [87] Zajackowski W, Quack G, Danysz W. Infusion of (+)-MK-801 and memantine-contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur J Pharmacol* 1996;296:239–46.

Estudio 3



Estudio 3: Los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA bloquean la adquisición y la expresión pero no la reinstauración de la preferencia de lugar inducida por cocaína en ratones.

Investigación original: Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, Ana Castillo, María A. Aguilar, José Miñarro (2006). NMDA and AMPA receptor antagonists block acquisition, expression but not reinstatement of cocaine-induced CPP in mice. Submitted to Eur. Neuropsychopharmacol.

Los cambios adaptativos a largo plazo que se producen en respuesta a la exposición a sustancias de abuso juegan un importante papel en el ciclo de la adicción y pueden subyacer al deseo intenso (craving) y al refuerzo condicionado. Investigaciones recientes sugieren que otros neurotransmisores, diferentes a la dopamina, pueden desempeñar un papel crítico en el establecimiento de la dependencia a drogas. Un gran número de investigaciones indican que los aminoácidos excitatorios, mediadores críticos de la plasticidad neural, podrían ser candidatos ideales como responsables de los cambios adaptativos que se producen durante el proceso adictivo.

La relación entre cocaína y la neurotransmisión glutamatérgica se ha establecido de forma indudable. La administración de cocaína en ratas incrementa de forma significativa los niveles de glutamato en varias áreas cerebrales límbicas, tanto tras la administración aguda como crónica. Esta activación se ha relacionado con los efectos comportamentales de este psicoestimulante y más recientemente, con la inducción de la potentiation a largo plazo en las neuronas dopaminérgicas del ATV. Los terminales nerviosos dopaminérgicos estriatales poseen receptores NMDA localizados

presinápticamente, sugiriéndose que la regulación de la liberación de DA puede estar mediada por dichos receptores.

La manipulación de la neurotransmisión glutamatergica mediante el uso de antagonistas del receptor del glutamato modifica muchos de los efectos agudos de la administración de cocaína, tales como la sensibilización a los efectos motores que se puede observar tras la administración repetida o la actividad motora condicionada. Además, la sensibilización comportamental a la cocaína se asocia con un aumento de la expresión del receptor AMPA en el N Acc y de los niveles de glutamato en la CPFm. Igualmente, los receptores ionotrópicos del glutamato en el N Acc afectan a la autoadministración, la hiperlocomoción y la sensibilización inducida por cocaína. Datos recientes indican que la activación de las aferencias glutamatérgicas desde la amígdala y la corteza prefrontal es crítica para que los comportamientos adictivos emerjan. Diversos estudios utilizando el modelo de recaída han observado que, independientemente de la modalidad del estímulo utilizado en la inducción, la integridad de la neurotransmisión glutamatérgica en la corteza prefrontal es siempre necesaria.

A pesar del conocido papel que el glutamato presenta en las acciones de la cocaína, los efectos de diversos antagonistas glutamatérgicos sobre las acciones reforzantes de la cocaína siguen siendo confusos. El bloqueo del receptor NMDA en ratas reduce la autoadministración de cocaína, aunque en algunos casos de forma inespecífica. Sin embargo el bloqueo de los receptores NMDA en ratones no afectó dicha autoadministración. Con respecto al antagonista NMDA, MK-801, algunos estudios sugieren que incluso podría incrementar las acciones reforzantes de la cocaína. Por otra parte, el receptor AMPA parece ser necesario para que se produzca autoadministración de cocaína, puesto que la mayor parte de los estudios demostraron que este comportamiento

operante está disminuido o suprimido tras del bloqueo de este receptor, centrándose principalmente estos trabajos en el restablecimiento de la autoadministración.

El otro paradigma fundamentalmente empleado en el estudio de los efectos reforzantes de la cocaína es el CPL. Con este procedimiento, los animales se entrenan para asociar un ambiente distintivo con las inyecciones de la droga, y se les somete a continuación a una extinción durante el cual se exponen al mismo ambiente, pero en ausencia de la droga. La reaparición de la preferencia por ese ambiente se determina tras inyecciones "priming" no contingentes de la droga. En ratas y ratones, el bloqueo del receptor NMDA suprime la adquisición del CPL inducido por la cocaína, aunque en la mayoría de casos, la expresión no se ve afectada. Inversamente, el bloqueo del receptor AMPA suprime la expresión pero no la adquisición de este condicionamiento, excepto cuando el antagonista se administra en el ATV. Este último resultado sugiere que la actividad glutamatérgica en el ATV puede ser crucial para aprender la asociación entre los estímulos ambientales y la exposición a la cocaína.

Kalivas (1995) ha sugerido que el desarrollo de tolerancia, dependencia o sensibilización, a posiblemente todas las drogas psicoactivas, puede atenuarse o suprimirse tras un pretratamiento con antagonistas NMDA. Así, las drogas que afectan este sistema de neurotransmisión podrían ser útiles para el tratamiento de la adicción a la cocaína. La memantina es el antagonista NMDA más ampliamente utilizado en seres humanos, pero los trabajos realizados hasta el momento no muestran resultados positivos, e incluso en algunos adictos se han observado incrementos significativos a ciertos efectos subjetivos de la misma.

El propósito del presente trabajo es el de evaluar el papel de los receptores NMDA y AMPA sobre los efectos reforzantes a largo plazo de la cocaína utilizando para ello el paradigma de CPL. La capacidad de las señales asociadas con la droga para inducir el deseo intenso y la recaída en el comportamiento de búsqueda de la droga es uno de los mecanismos por los cuales la adicción se mantiene. La recaída en la conducta de búsqueda de la droga tras un período de abstinencia representa uno de los principales factores que conducen a la perpetuación del ciclo adictivo. Los procedimientos de extinción proporcionan una medida de las características motivacionales de las drogas, hecho que viene reflejado por la persistencia en la conducta de búsqueda aún en ausencia de la droga. Además, nos ayudan a determinar la importancia de las características motivacionales incentivas de los estímulos asociados con la droga o de la administración no contingente de esta, en la recuperación de la respuesta.

La técnica de CPL nos permite estudiar las características de recompensa o incentivas de las drogas en animales libres de fármaco, al evaluar el tiempo que pasan en un ambiente previamente asociado con los efectos de la misma. Esta prueba puede representar una herramienta útil para evaluar la sensibilidad individual a las características motivacionales de las sustancias adictivas. Las drogas que producen adicción en seres humanos también producen CPL en roedores, así la cocaína induce un CPL bien documentado en ratones. Recientemente, el procedimiento de condicionamiento de la preferencia de lugar se ha empleado para estudiar la recaída en la conducta de búsqueda de la droga, siendo la morfina y la cocaína las sustancias más estudiadas. Tras haberse establecido un CPL, esta preferencia es extinguida gradualmente por la exposición repetida de los animales al compartimento asociado con la droga pero en un estado libre de fármaco. Una vez extinguido el CPL, una inyección priming de la droga será capaz de reinstaurar de nuevo esta preferencia. Esta metodología nos permite investigar el posible papel de los receptores NMDA

(utilizando el antagonista no competitivo de baja afinidad, memantina) o AMPA (utilizando el antagonista CNQX) en las diferentes fases del procedimiento, adquisición, expresión o recaída de la preferencia una vez extinguida.

Para los experimentos de CPL, se utilizaron cuatro cajas idénticas de "Plexiglás", con dos compartimentos de igual tamaño, que diferían en el color de sus paredes (blanco/negro) y en la textura del suelo (liso/rugoso), separados por un área central. El procedimiento, no sesgado ("unbiased") y contralanceado en términos de la preferencia inicial y del procedimiento de administración de los fármacos, constaba de tres fases. En la primera fase, llamada de pre-condicionamiento (Pre-C), los animales tenían libre acceso a los compartimentos durante 15 minutos (900 segundos) realizándose en dos días consecutivos. El tercer día, se realizó la misma prueba que los días anteriores pero en este caso se registró el tiempo transcurrido por los animales en cada uno de los compartimentos. Los animales que mostraron una fuerte aversión (menos de 300 s) o preferencia (más de 600 s) por alguno de los compartimentos fueron descartados del experimento. Una vez establecidos los grupos según el tratamiento, la mitad de los animales en cada uno de los grupos recibían el fármaco o suero fisiológico en cada compartimento. Después de la asignación de compartimentos, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que permanecían en el lugar apareado con el fármaco o con el vehículo en la fase de Pre-C. Este es un paso importante en el procedimiento experimental que evita cualquier preferencia antes de iniciar el condicionamiento.

En la segunda fase (condicionamiento), cuya duración es de cuatro días, los animales recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante treinta minutos en el compartimento elegido para ser asociado con el vehículo. Tras un intervalo de cuatro horas, recibieron una

inyección de cocaína, de uno de los antagonistas glutamatérgicos o ambos fármacos antes de ser confinados en el compartimento elegido para ser asociado con la droga.

Durante la tercera fase, llamada Post-condicionamiento (Post-C o test), se registraba el tiempo que el animal, libre de cualquier tratamiento (excepto en el experimento 3), pasaba en cada compartimento durante 900 segundos. Para evaluar el papel de los antagonistas glutamatérgicos en la expresión del CPL inducido por la cocaína, cuatro grupos recibieron estos fármacos 30 minutos antes de la sesión de test.

La diferencia, en segundos, entre el tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la droga entre el día de Pre-C y del Post-C es una medida del grado de preferencia inducido por la cocaína. Si no existen diferencias, indicaría que el antagonista glutamatérgico ha bloqueado el CPL inducido por la cocaína, mientras que lo opuesto indicaría que este fármaco no ha sido capaz de bloquear esta preferencia.

Tras la prueba de Post-C realizada el octavo día, los animales realizaron sesiones de 15 minutos de extinción semanal, que consistieron en colocar a los animales en el aparato hasta que el tiempo pasado en el compartimento apareado con la droga para cada grupo de animales fuera similar al de la fase de pre-condicionamiento. Esta medición fue repetida 48 horas después con el fin de confirmar la extinción.

Dos días después de esta confirmación, se evaluaron los efectos de una dosis priming de la droga correspondiente. La prueba de recaída fue igual a la de la sesión de post-condicionamiento, a excepción de que los animales realizaron el test tras la administración de la correspondiente inyección de droga o de salino. Todas las inyecciones se administraron 15 minutos antes de la prueba de restauración en el estabulario, siendo un

lugar no contingente a la inyección empleada anteriormente en el condicionamiento.

Los resultados indicaron que el grupo condicionado con 50 mg/kg de cocaína, y los grupos que recibieron esta droga más 5 mg/kg de memantina o 1 mg/kg de CNQX durante la adquisición del CPL, así como el grupo que recibió 1 mg/kg de CNQX antes de la expresión del condicionamiento, mostraron preferencia por el lugar asociado a la cocaína.

En una serie de grupos condicionados con cocaína, una vez extinguida la preferencia, los antagonistas glutamatérgicos no fueron capaces de reinstaurar la respuesta. Sin embargo, estos mismos antagonistas administrados junto a una dosis priming de 25 mg/kg de cocaína no fueron capaces de bloquear el re-establecimiento de la preferencia. En todos estos grupos, el tiempo que los animales pasan en el compartimento asociado con la droga fue mayor durante la sesión de reinstauración que en las sesiones de Pre-C y extinción.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA o AMPA impide la adquisición y la expresión del CPL inducido por cocaína. Ni la memantina ni el CNQX presentaron efectos motivacionales evaluados mediante este procedimiento. Por otra parte, el restablecimiento de la preferencia inducida por inyecciones priming de cocaína no pudo ser bloqueada por ninguno de los compuestos. Así pues, el bloqueo de los mencionados receptores del glutamato no altera la restauración del CPL inducido por la cocaína. Por otro lado, la memantina y el CNQX, por si mismos, no consiguieron restaurar la preferencia previamente inducida por la cocaína.

Como se esperaba, la administración de 50 mg/kg de cocaína en ratones indujo CPL. En nuestro laboratorio, este resultado se ha observado

previamente en diversos estudios utilizando el mismo procedimiento experimental. La adquisición de este condicionamiento es claramente suprimida por cualquiera de los antagonistas del receptor del glutamato empleados, siendo estos resultados coherentes con la literatura, aunque ni la memantina ni el CNQX habían sido estudiados previamente en ratones empleando el procedimiento de CPL. En ratas, la memantina administrada conjuntamente con cocaína durante la adquisición del condicionamiento, bloquea el establecimiento de la preferencia. Resultados similares se han obtenido con otros antagonistas NMDA, tales como el MK-801 o el antagonista del receptor NMDA/glycine L-701,324. Sin embargo, utilizando el procedimiento de la autoadministración de cocaína los resultados publicados hasta el momento son contradictorios. Aunque en ratas, la memantina disminuyó de forma dosis dependiente la autoadministración de cocaína cuando se utiliza un programa de razón fija y produjo una disminución de los efectos con un programa progresivo, en ratones el tratamiento previo con este antagonista NMDA, previno la adquisición de la nicotina pero no tuvo efectos sobre la autoadministración de cocaína.

Los antagonistas AMPA han sido los menos estudiados y la mayoría de los trabajos se han realizado en ratas, observándose también disparidad en los resultados obtenidos. Mientras que el DNQX no afecta la adquisición de CPL inducido por cocaína, el CNQX administrado en el ATV bloquea la adquisición del condicionamiento. Con la autoadministración, el CNQX inyectado en el amígdala basolateral no afecta el refuerzo condicionado por la cocaína (tono + luz solamente), pero disminuyó el número de respuestas en un programa de segundo orden, donde se produce la presentación contingente de un estímulo que ha adquirido características reforzantes.

La falta de preferencia observada puede explicarse por diferentes motivos. En primer lugar, los antagonistas del glutamato podrían ser aversivos por sí mismos, pero nuestros resultados han demostrado que ni la

memantina ni el CNQX presentan efectos motivacionales. Una segunda explicación podría ser que el bloqueo del receptor NMDA o del AMPA disminuya la potencia reforzante de la cocaína. El hecho de que otro antagonista del receptor NMDA, el MK-801 incremente los efectos reforzantes de la cocaína en ratas utilizando el paradigma de la autoadministración restaría validez a esta hipótesis. Además, la memantina administrada en consumidores de cocaína acrecienta la sensación subjetiva placentera que produce esta droga. En un estudio reciente, Collins y colaboradores (2006) observaron que la administración de memantina en fumadores de cocaína en mantenimiento con metadona no alteró los efectos subjetivos o reforzantes de la cocaína, aunque si se incrementaron respuestas cardiovasculares. Por último, Newman y Beardsley (2006), demostraron que la memantina potenció la tasa de autoadministración de cocaína en monos. Estos resultados, descritos tanto en seres humanos como en animales, sugieren que el bloqueo de los receptores NMDA no disminuye los efectos subjetivos de recompensa de la cocaína. Una tercera explicación podría ser que se produzca una disminución en la capacidad para aprender la asociación entre la cocaína y el ambiente. El bloqueo de los receptores del glutamato puede afectar de forma crítica las vías glutamatérgicas necesarias para asociar la cocaína con las señales ambientales que la predicen. El bloqueo de los receptores NMDA o AMPA afecta a muchas conductas inducidas por la cocaína que implican una cierta clase de aprendizaje, tales como la sensibilización comportamental inducida por la cocaína o la actividad motora condicionada. Por otra parte, estos compuestos no consiguen afectar otros efectos de la cocaína independientes de los procesos de aprendizaje, como la hiperactividad locomotora o el aumento del factor de liberación de corticotropina en el hipotálamo. Aunque las tres explicaciones no son excluyentes, y todas podrían participar en los resultados observados, la disminución del aprendizaje asociativo durante la adquisición del condicionamiento puede ser el factor más importante. Apoyando esta hipótesis, en el estudio de

Newman y Beardsley (2006) mencionado anteriormente, el pre-tratamiento con memantina disminuye de forma dosis dependiente la respuesta mantenida por un refuerzo condicionado, pero cuando la respuesta fue reforzada mediante infusiones de cocaína, el antagonista NMDA no la modifica.

Cuando el bloqueo de los receptores NMDA o AMPA se produjo antes de la expresión del CPL, en el día del Post-C, la preferencia también fue suprimida. En varios estudios, el bloqueo de los receptores NMDA con MK-801 o L-701,324 no afectó a la expresión del CPL, pero otros autores encontraron que la memantina administrada junto con cocaína en tres ensayos condicionados previno tanto la adquisición como la expresión del condicionamiento. Los antagonistas del receptor AMPA han sido menos estudiados, encontrando que el DNQX deteriora la expresión pero no la adquisición del CPL inducido por cocaína. Aunque para la mayor parte de estos autores, los receptores NMDA parecen estar implicados en las características de recompensa primaria de la cocaína y los AMPA son importantes solamente en el comportamiento inducido por estímulos asociados previamente a la acción de la droga (expresión del CPL), nuestros resultados sugieren que estos receptores están implicados en ambos aspectos del procedimiento.

Como hemos mencionado anteriormente, una inyección no contingente de cocaína (utilizando la mitad de la dosis que se ha empleado para el condicionamiento), es capaz de reinstaurar la preferencia extinguida por el compartimiento asociado a la cocaína. Contrariamente a los resultados obtenidos cuando la memantina o el CNQX fueron administrados durante la adquisición o la expresión del CPL, cuando los animales han adquirido correctamente la asociación entre un ambiente distintivo y la cocaína, ninguno de los antagonistas del glutamato fue capaz de bloquear el restablecimiento de la preferencia. Además, estos antagonistas no fueron

capaces de inducir la reinstauración de la preferencia por sí mismos, aunque la dosis más alta de CNQX mostró una tendencia a incrementar el tiempo que los animales pasaron en el compartimiento asociado con la cocaína.

No se han realizado estudios previos sobre los efectos de los antagonistas del glutamato en la reinstauración de la preferencia una tras la extinción del CPL. Los estudios de autoadministración se han centrado principalmente en las consecuencias del bloqueo de los receptores AMPA, pero en un estudio realizado administrando memantina antes de una inyección priming de cocaína, se observó como esta disminuía de forma inespecífica el número de respuestas, fundamentalmente debido a un incremento en el número de respuestas de la palanca no efectiva. En este mismo trabajo, la memantina fue incapaz de suprimir el aumento selectivo de respuestas en la palanca de refuerzo inducido por exposiciones a los estímulos relacionados con la cocaína. Por otra parte, el antagonista del receptor NMDA, CGP 39551 no consiguió afectar la autoadministración de cocaína inducida por las claves ambientales. Así, los pocos estudios realizados hasta el momento, no parecen otorgar un papel específico a los receptores NMDA en el restablecimiento del comportamiento de búsqueda de la cocaína, en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Se ha sugerido un papel más importante para el receptor AMPA, especialmente la subunidad GluR1, la cual se cree que promueve la extinción. El procedimiento de extinción durante la abstinencia de la administración crónica de cocaína provoca incrementos en las subunidades GluR1 y GluR2/3 del receptor AMPA en la corteza del N Acc, y particularmente el incremento en el GluR1 se asocia positivamente con el nivel de extinción alcanzado durante el entrenamiento. Tras ser inyectado en la amígdala basolateral, el CNQX bloqueó el restablecimiento de la

autoadministración de cocaína tras una inyección priming. Además, el CNQX inyectado en el N Acc bloquea el restablecimiento obtenido por una inyección de cocaína en la corteza prefrontal. Igualmente, el CNQX también atenúa el restablecimiento de la autoadministración de la cocaína inducido por claves ambientales relacionadas con la droga. Al contrario del NMDA, el receptor AMPA parece ser crítico para el restablecimiento de la autoadministración inducida tanto por las claves ambientales como por las dosis priming. Nuestros resultados demuestran, por el contrario, que los receptores AMPA no desempeñan un papel crítico en el restablecimiento del CPL inducido por dosis priming de cocaína.

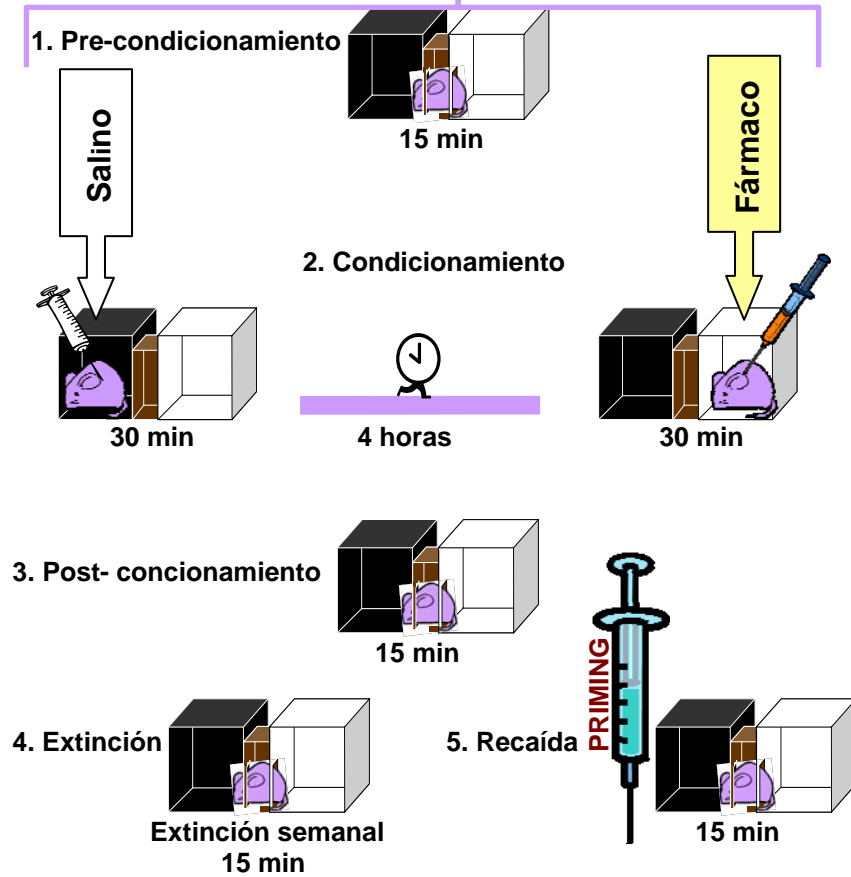
Existía un consenso general sobre el hecho de que la actividad dopaminérgica en el N Acc mediaba la recaída inducida por dosis priming de cocaína. Sin embargo, Kalivas y McFarland (2003) argumentaron que esta recaída estaba mediada, no por la transmisión de la DA, sino por la activación glutamatérgica de los receptores AMPA en el N Acc. Sin embargo, esta hipótesis no puede explicar algunos resultados como por ejemplo, la atenuación de la recaída inducida por cocaína tras lesiones en la amígdala basolateral, el bloqueo de los receptores de DA D1 en el mismo núcleo, o la inactivación por lidocaína del subículo ventral. Además, esta recaída también se bloquea por la infusión del SCH 23390 en la corteza del accumbens, pero no en el núcleo. En los animales en los que se ha extinguido la autoadministración, una dosis priming de cocaína incrementa la expresión del Fos sobre todo en las regiones del cerebro que reciben una inervación dopaminérgica relativamente densa, siendo este efecto un indicador de las acciones farmacológicas incondicionadas de la cocaína en la estimulación de la transmisión DA. En conjunto todos estos resultados nos sugieren que la reinstauración de la preferencia inducido por cocaína puede estar mediada tanto por la transmisión dopaminérgica como por la glutamatérgica en el N Acc y otros territorios mesocorticolímbicos.

En el paradigma de CPL no se permite a los animales administrarse la cocaína libremente, como sí ocurre en la autoadministración, hecho que debe ser tomado en consideración, puesto que los procesos de restauración pueden verse afectados de forma diferente. Tras una inyección priming de cocaína, el incremento en la liberación del glutamato, que proviene del cortex prefrontal, a nivel del N Acc se observó solamente, en ratas entrenadas a auto administrarse la cocaína libremente, no así en aquellas en las la administración la controló el experimentador. Con las condiciones de nuestro paradigma (cocaína administrada no libremente y el uso de una dosis priming para la inducción de la recaída), el componente dopaminérgico puede ser más fuerte que el glutamatérgico, y por tanto el bloqueo de los receptores NMDA o AMPA sería insuficiente para suprimir el restablecimiento de la preferencia.

Nuestros resultados confirman que existe una disociación entre el circuito que media las características de refuerzo de una droga y la recaída en la búsqueda de la misma inducida por inyecciones priming, y evaluada mediante el paradigma de CPL. El sistema glutamatérgico juega un importante papel en el aprendizaje y la memoria así como en las propiedades reforzantes de las sustancias de abuso, apoyando los resultados obtenidos en este estudio la idea de que el glutamato media los aspectos del aprendizaje de la drogadicción. La adquisición y la expresión de la asociación entre un ambiente determinado y los efectos de la cocaína dependen de los receptores NMDA y AMPA, pero, por el contrario, la reinstauración de la preferencia inducida por dosis priming parece ser, por lo menos en parte, independiente de estos receptores. Mientras que la memantina o los antagonistas AMPA pueden ser tratamientos útiles en el comportamiento de búsqueda o deseo intenso de la cocaína inducidos por las claves ambientales, su efecto sobre los procesos de refuerzo son más complejos y serían necesarias más investigaciones sobre su potencial como tratamiento en los desordenes debidos al abuso de la cocaína.

PROTOCOLO DE ADMINISTRACION

CPL



**Role of NMDA and AMPA receptors in acquisition, expression and reinstatement
of cocaine-induced CPP in mice**

Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J
Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Avda.
Blasco Ibáñez 21, 46010 Valencia, Spain. (Submitted to Eur. Neuropsychopharmacol).

Correspondence author:

José Miñarro
Departamento de Psicobiología,
Facultad de Psicología
Universitat de Valencia
Avda. Blasco Ibáñez 21, 46010
Valencia, Spain.
Tel.: +34 96 386 4020
Fax: +34 96 386 4668
e-mail: jose.minarro@uv.es

ABSTRACT

The present study evaluate the role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors on the long-lasting rewarding effects of cocaine in mice, using the conditioned place preference (CPP) paradigm. Cocaine-induced CPP was studied pairing this drug with different memantine or CNQX doses during either the acquisition or the expression phase of the procedure. Once CPP was established, and the preference extinguished, reinstatement was induced by a priming dose of cocaine. Both antagonists, which in themselves do not present motivational actions, abolished the acquisition and expression of the CPP. Neither of the antagonists precipitated reinstatement of the preference induced by cocaine and nor did they block the cocaine-primed reinstatement. Our results confirm that the acquisition and expression of the association of a distinct environment with cocaine effects are dependent on NMDA and AMPA receptors, but, on the contrary, cocaine-primed reinstatement seems to be independent of these receptors.

Key words: CPP, cocaine, NMDA, AMPA, mice, reinstatement

INTRODUCTION

The long-lasting adaptative changes occurring in response to drug exposure are thought to play a key role in the addictive cycle and may represent the basis for drug craving and conditioned reinforcement. Recent evidence suggests that neurochemical effectors other than dopamine (DA) may play a critical role, and that excitatory amino acids may be relevant in this respect (Pulvirenti, 2003). These amino acids are considered critical mediators of neural plasticity within the central nervous system (Bliss and Collingridge, 1993), making them ideal candidates as agents in the development of adaptative changes, which may represent integral parts of the addictive process.

The relation between cocaine and glutamate neurotransmission has been clearly established. Acute and chronic administration of cocaine in rats significantly elevates glutamate levels in various limbic brain areas (Bell et al., 2000). This activation has been linked to the behavioural effects of cocaine and recently to the induction of long-term potentiation in DA neurons within the ventral tegmental area (VTA) (Ungless et al., 2001). Striatal dopaminergic nerve terminals have been demonstrated to possess the NMDA receptor and these presynaptic receptors are involved in an increase in DA release (Krebs et al., 1991), suggesting that regulation of the central DA release may be mediated via these receptors.

Manipulation of glutamatergic neurotransmission by means of glutamate receptor antagonists alters many of the acute administration effects of cocaine, such as sensitization to the locomotor stimulation induced by repeated administration of cocaine (Karler et al., 1989; Yap et al., 2005; Scheggi et al., 2002), or conditioned motor activity (Bespalov et al., 2000). Additionally, behavioural sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens (N Acc) (Boudreau and Wolf, 2005) and glutamate levels in the medial prefrontal cortex (mPFC) (Williams and Steketee, 2004). The ionotropic glutamate receptors in the N Acc influence self-administration of cocaine and relapse (Cornish and Kalivas, 2000), cocaine-induced hyperlocomotion (Witkin, 1993) and behavioural sensitisation (Wolf, 1998). Recent data indicate that activation of glutamatergic afferents from the amygdala and prefrontal cortex is critical in the expression of addictive behaviours. Several

studies using the reinstatement model of relapse have found, regardless of the stimulus modality, that glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex is necessary (Capriles et al., 2003; McFarland et al., 2003; Shalev et al., 2002).

Despite the proved role of glutamate in cocaine actions, the results concerning the effects of the different glutamate receptor antagonists on cocaine reward remain unclear. In rats, the NMDA receptor antagonist memantine (3,5-dimethyladamantan-1-amine hydrochloride) diminished cocaine self-administration in a fixed ratio, producing decreasing effects in a progressive ratio (Hyytiä et al., 1999), although, self-administration in mice was not affected (Blokhina et al., 2005). In a recent study in monkeys, although memantine attenuated the conditioned reinforcing effects of cocaine-associated stimuli, it increased the levels of cocaine self-administration (Newman and Beardsley, 2006). Administration of memantine prior to a priming injection of cocaine eliminated the differences between reinforcer-lever and non-reinforcer, although this effect was unspecific (Bespalov et al., 2000). For the NMDA antagonist MK-801, there are some reports that suggest that it could increase the rewarding actions of cocaine (Hyytiä et al., 1999). On the other hand, the AMPA receptor seems to be vital for cocaine self-administration, since most of the studies found that this operant behaviour is decreased or abolished after the blockade of this receptor, these studies mainly focusing on the reinstatement of the self-administration (Bäckström and Hyytiä, 2003, 2006; Park et al., 2002; Cornish and Kalivas, 2000).

The other paradigm employed for studying cocaine reward is the CPP procedure. In rats and mice, the blockade of the NMDA receptor abolishes the acquisition of the cocaine-induced CPP, although in most cases, the expression was not affected (Cervo and Samanin, 1995; Kim et al., 1996; Kolitska and Biala, 1999). Conversely, the blockade of the AMPA receptor abolished the expression but not the acquisition of this conditioning, except when the antagonists were administered in the VTA (Cervo and Samanin, 1995; Harris and Aston-Jones, 2003). This latter result suggests that glutamatergic activity in the VTA may be crucial for learning to associate environmental stimuli with cocaine exposure.

Kalivas (1995) has suggested that the development of tolerance, dependence and or sensitization to virtually all the psychoactive drugs can be attenuated or abolished by

pre-treatment with NMDA antagonists. Thus, drugs which affect this neurotransmitter system may be useful for the treatment of cocaine addiction. Memantine is the most widely studied NMDA antagonist in humans, although research carried out until the moment does not show positive results, since even significant increases in some of the subjective good effects of cocaine have been observed in some cocaine addicts (Collins et al., 1998; Collins et al., 2006; Vosburg et al., 2005).

The aim of the present study is to evaluate the role of NMDA and AMPA receptors in the long-lasting rewarding effects of cocaine, using the CPP paradigm, which has been extensively used to assess the rewarding properties of cocaine. The ability of drug-associated cues to induce craving and relapse to drug-seeking behaviours is one of the potential mechanisms by which addiction endures. Extinction procedures provide a measure of the motivational properties of drugs as reflected by the persistence of drug-seeking behaviour in the absence of the drug, providing a powerful means of assessing the incentive motivational properties of drug-paired stimuli or noncontingent drug administration in reinstating response (Pulvirenti, 2003).

The CPP is an animal model of such cue-eliciting conditioning that can be used to study drug-seeking behaviours (Tzschentke 1998). With this paradigm, the rewarding or incentive properties of drugs are assessed in drug-free animals by the amount of time spent in the environment previously paired with the drug effects. This test may represent a useful tool to evaluate individual sensitivity to the incentive properties of addictive drugs. Drugs with abuse liability in humans reliably produce CPP in rodents (Tzschentke 1998), cocaine inducing a well documented CPP in mice (Cunningham et al. 1999; Seale and Carney 1991; Brabant et al., 2005). In recent years, the place conditioning procedure has been increasingly used to study the relapse into drug seeking behaviours, morphine (Ribeiro do Couto et al., 2005a,b) and cocaine (Mueller and Stewart 2000; Szumlinski et al. 2002; Sanchez et al. 2003) being the most studied. After the establishment of a reliable CPP for the drug-paired compartment, this preference is gradually extinguished by repeated exposure of the animals to the drug-paired compartment in a drug-free state. At the end of the extinction procedure, a priming drug injection may be tested to investigate whether it is able to reinstate a significant CPP (Brabant et al., 2005). This methodology allows us to investigate the possible role of the NMDA (using its low-affinity, uncompetitive channel blocker,

memantine) or the AMPA (using its antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX) receptors in the different phases of the procedure: acquisition, expression or reinstatement of the extinguished preference. Once CPP was established, after repeated test trials in which the animals were exposed to both compartments in a drug-free state, the preference was extinguished. At the end of the extinction procedure, a reinstatement of the preference was induced by a cocaine dose half of that used to induce conditioning (Maldonado et al., 2006), by the glutamate antagonists alone or by both drugs together.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

In this study, 232 albino male mice of the OF1 strain, acquired commercially in Charles River (Barcelona, Spain) were used. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of four in transparent plastic cages (22 x 38 x 14,5 cm), for an adaptation time of 10 days, under the following conditions: constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), a reversed light schedule (white lights on 19:30-07:30 h), and food and water available *ad libitum*, except during the behavioural test. Procedures involving mice and their care conformed to national, regional and local laws and regulations, and are in accord with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, November 24, 1986).

Apparatus

In the CPP experiments, four identical Plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm long x 31.5 cm wide x 34.5 cm high) separated by a grey central area (13.8 cm long x 31.5 cm wide x 34.5 cm high) were used. The compartments had different coloured walls (black vs. white) and also distinct floor textures (fine grid in the white compartment and wide grid in the black one). The floor in the central area was smooth and a little elevated with respect to the floors of the other compartments, with doors (14 cm height x 8.5 cm width) that allowed the animal to pass through. Four infrared light beams in the entrance of each compartment of the box and six in the central area recorded the position of the animal and its crossings from one compartment to the other. When the animal interrupted the first beam at the entrance of

one compartment but did not interrupt the beam in the central area, the apparatus registered the disruption as an entry, the location of the mouse always being known. An IBM PC computer using MONPRE 2Z software (CIBERTEC, SA, Spain) controlled the equipment utilized for these experiments.

Drugs

CNQX (1 and 10 mg/kg), Memantine (5 and 10 mg/kg), cocaine (Laboratorios Alcaliber S.A., Madrid, Spain) and physiological saline (NaCl 0.9%) were used in these experiments. Drugs were diluted in physiological saline (0.1 mg/ml), at a constant volume (10 ml/kg) and administered i.p.

Procedure

Acquisition and expression of the place preference

The experiment consisted of three phases and was carried out following an unbiased procedure. During the first phase or pre-conditioning (Pre-C), mice were given free access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) each day for 2 days. On day 3, the time spent by the animal in each compartment was recorded for 900 s. Animals showing a strong unconditioned aversion or preference (less than 33% or more than 66% of the session time, i.e. 300 and 600 s, respectively) for any compartment were discarded. In each treatment group, half of the animals received the drug or vehicle in one compartment and the other half in the other. After assigning the compartments, there were no significant differences between the time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments during the preconditioning phase. This is an important step in the experimental procedure that avoids any preference bias before conditioning.

In the second phase or conditioning, which had a duration of 4 days, animals received an injection of physiological saline immediately before being confined in the vehicle-paired compartment for 30 min and after an interval of 4 h they received an injection of saline (Control), cocaine (Acq-Coc), one of the glutamatergic antagonists (Mem5, Mem10, CNQX1, CNQX10) or both (Acq-Mem5, Acq-Mem10, Acq-CNQX1,

and Acq-CNQX10), immediately before confinement in the drug-paired compartment for 30 min. Confinement was carried out in both cases by closing the guillotine door that separates the two compartments.

During the third phase or post-conditioning (Post-C), on day 8 the guillotine door separating the two compartments was removed and the time spent by the untreated mice in each compartment was recorded for 900 s. In order to evaluate the role of the glutamate antagonists in the expression of cocaine-induced CPP, four groups conditioned with cocaine received these drugs 30 min before the test session (Exp-Mem5, Exp-Mem10, Exp-CNQX1 and Exp-CNQX10).

The difference, in seconds, between the times spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and that spent in the Pre-C is a measure of the degree of reward induced by cocaine. If there is no difference, then glutamatergic antagonists (CNQX or Memantine) have blocked cocaine-induced CPP, while the opposite indicates the drug cannot block this reward.

Extinction and reinstatement of the place preference

After the Post-C test on day 8, animals conditioned with cocaine underwent a weekly extinction session schedule, which consisted of the placement of the animals in the apparatus (without guillotine doors separating the compartments) for 15 min until the time spent in the drug-paired compartment for each group of animals was similar to that of the Pre-C session. This measure was repeated 48 h later in order to confirm the extinction.

Two days after the extinction was confirmed, the effects of the priming doses of the corresponding drug were evaluated. The tests of reinstatement were the same as for the Post-C (free ambulation for 15 min) except that the animals were tested after the administration of the respective drug or saline injection (R-Mem5, R-Mem10, R-CNQX1, R-CNQX10, R-C25, R-C25Mem5, R-C25Mem10, R-C25CNQX1, and R-C25CNQX10). All the priming injections were given 15 min before the reinstatement tests in the colony room, a non-contingent place to the previous conditioning injection.

Statistical analyses

Data of the time spent in the drug-paired compartment were analysed with a mixed analysis of variance (ANOVA) with Treatment as a *between subjects* variable with a different number of levels depending on the groups of treatment, and Days as a *within subjects* variable with four levels (Pre-C, Post-C, extinction and reinstatement). To make post-hoc comparisons Newman-Keuls and Simple Effects tests were performed. For the acquisition and expression studies, two different ANOVA were conducted: that mentioned previously (including only the groups which achieved preference), plus another including all the groups and with only two levels for the variable Days (Pre-C and Post-C).

RESULTS

The results regarding the effect of memantine and CNQX on the cocaine-induced CPP are represented in Figures 1, 2 and 3. The ANOVA performed with all the groups revealed a significant effect of the variable Treatment [$F(13,114)=1.902$; $p<0.03$], Days [$F(1,114)=13.730$; $p<0.0003$] and Interaction Treatment x Days [$F(13,114)=1.899$; $p<0.03$]. Newman-Keuls test indicated that the values of the CNQX1 group were lower than the other groups due to the low (although non significant) values of the Post-C test. For the variable Days, there was a significant difference between Pre-C and Post-C ($p<0.01$), the time spent in the drug-paired compartment being higher in the latter. Post-hoc comparisons demonstrated that the group receiving 50 mg/kg of cocaine ($p<0.01$), and the Acq-Mem5 ($p<0.05$), Acq-CNQX1 ($p<0.01$), and Exp-CNQX1 ($p<0.02$) groups presented CPP. In these groups, after extinction was confirmed, a new ANOVA including the four sessions revealed a significant effect of the variable Days [$F(3,105)=18.731$; $p<0.0001$] and Interaction Treatment x Days [$F(9,105)=2.056$; $p<0.04$]. The variable Treatment [$F(3,35)=1.256$; $p<0.3046$] was not significant. A Newman-Keuls test indicated that the time spent in the drug-paired compartment during the Post-C and the reinstatement sessions was higher than during Pre-C and Extinction ($p<0.01$). In the group conditioned only with cocaine (Acq-Saline or Exp-Saline), and in that treated with 1 mg/kg of CNQX in the Post-C test, the reinstatement values were also significantly higher than those of the Post-C ($p<0.01$).

The results obtained for the reinstatement of cocaine-induced CPP by priming injections of memantine or CNQX can be seen in Figure 4. The ANOVA revealed a significant effect of the variable Days [$F(3,102)=8.695$; $p<0.0001$]. The variable Treatment [$F(3,34)=0.567$; $p<0.6406$] and the Interaction Treatment x Days [$F(9,102)=0.445$; $p<0.9075$] were not significant. A Newman-Keuls test showed that for the variable Days there was a significant difference between Post-C session with respect to Pre-C, extinction and reinstatement ($p<0.01$), the time spent in the drug-paired compartment being higher in the Post-C test.

On the contrary, the administration of 25 mg/kg of cocaine reinstated the preference in all the groups receiving a non-contingent injection of cocaine alone or plus memantine or CNQX (Figure 5). The ANOVA revealed a significant effect of the variable Days [$F(3,126)=11.501$; $p<0.0001$]. The variable Treatment [$F(4,42)=1.381$; $p<0.2567$] and the Interaction Treatment x Days [$F(12,126)=0.979$; $p<0.4729$] were not significant. In all these groups, time spent in the drug-paired compartment was higher during the Post-C and reinstatement sessions than during the Pre-C and the extinction ($p<0.01$).

DISCUSSION

The results obtained in this study show that the blockade of the NMDA or AMPA glutamate receptor prevents the acquisition and the expression of cocaine-induced CPP. Neither memantine nor CNQX presented motivational effects when evaluated by the CPP. On the other hand, the reinstatement of the cocaine-induced preference induced by priming injections of cocaine cannot be blocked by any of the compounds, i.e., the blockade of the afore mentioned glutamate receptors do not alter the restoration of the CPP induced by cocaine. Memantine and CNQX were not capable of restoring the preference for the cocaine-paired compartment.

As was expected, the administration of 50 mg/kg of cocaine in mice produced CPP. In our laboratory, this result has been previously observed in different studies using the same experimental procedure (Maldonado et al., 2006; Estelles et al., in press). Acquisition of this conditioning is clearly abolished by any of the glutamate receptor antagonists employed, these results being in agreement with the literature, although neither memantine nor CNQX had been previously studied in mice using the CPP

procedure. In rats, memantine administered with cocaine during the acquisition of the conditioning, blocked the induction of the preference (Kotlinska and Biala, 2000). Similar results have been obtained for other NMDA antagonists, such as MK-801 or the NMDA/glycine receptor antagonist L-701,324, which also prevented the acquisition of the cocaine-induced CPP in rats and mice (Cervo and Samanin, 1995; Kim et al., 1996; Kotlinska and Biala, 1999). In cocaine self-administration, the results in the literature are controversial. Although in rats, memantine dose-dependently decreased self-administration in a fixed ratio and produced a rate-decreasing effect in a progressive ratio schedule (Hyytiä et al., 1999), in mice, pretreatment with this NMDA antagonist prevented the acquisition of nicotine self-administration but did not have effect on cocaine (Blokhina et al., 2005).

The AMPA antagonists have been less studied, the results, all of them pertaining to rats, being controversial. While DNQX did not affect acquisition of cocaine-induced CPP (Cervo and Samanin, 1995), CNQX administered in the VTA blocked the acquisition of the conditioning (Harris and Aston-Jones, 2003). For the self-administration of cocaine, just as for the NMDA antagonist, the results are not in concordance. CNQX injected in the basolateral amygdala did not affect cocaine-conditioned reward (See et al., 2001), but decreased the number of cocaine responses in a second-order schedule of self-administration, where the response was controlled by the contingent presentation of previously neutral stimuli that had acquired conditioning reinforcing properties (Bäcktröm and Hyytiä, 2003).

This lack of preference observed can be accounted for by different explanations. Firstly, the glutamate antagonists employed could in themselves be aversive, but the results showed that neither memantine nor CNQX presented significant motivational properties in the CPP, i.e. there were no variations in the time spent by the mice in the drug-paired compartment after the conditioning. Similar results have been found in our and other laboratories (Maldonado et al., 2003; Popik et al., 2003; Ribeiro Do Couto et al., 2004). A second explanation could be that the blockade of the NMDA or AMPA receptors decreased the reward potency of cocaine. The fact that another NMDA receptor antagonist, MK-801, has proved to increase the rewarding actions of cocaine in rats using the self-administration paradigm would rest validity from this hypothesis (Pierce et al., 1997; Ranaldi et al., 1996). Furthermore, memantine administered to cocaine

consumers increased some of the subjective feeling that this drug produced, such as those referred to as “good drug effects” or “high”, which would be less likely to be due to a decrease in the rewarding actions of the drug (Collins et al., 1998). In a recent study, Collins and co-workers (2006) reported that memantine maintenance in methadone-maintained cocaine smokers did not alter the subjective or reinforcing effects of cocaine, although several cardiovascular responses were increased. Finally, in a recent work, memantine increased the rate of cocaine self-administration in rhesus monkeys (Newman and Beardsley, 2006). These results, found in humans and animals, suggest that the blockade of the NMDA receptors does not decrease the subjective rewarding effects of cocaine. A third possible explanation could be the decreased ability to learn the association between cocaine and the environment. The blockade of glutamate receptors may affect critical glutamate input necessary to associate cocaine with the environment cues that predict it. The blockade of the NMDA or AMPA receptors affect many cocaine-induced behaviours which implies some kind of learning processes such as cocaine-induced behavioural sensitization (Kim et al., 1996), or conditioned motor activity (Bespalov et al., 2000). On the other hand, these compounds fail to influence other cocaine effects which are independent of learning processes, such as locomotor hyperactivity (Maj et al., 1995) or an increase in the corticotrophin releasing factor in the hypothalamus (Zhou et al., 1998). Although the three explanations are not exclusive, and all of them could contribute to the results obtained, the impairment of the associative learning during the acquisition of the conditioning may be the most important factor. Supporting this hypothesis, pre-treatment with memantine dose-dependently decreased responding maintained by the conditioned reinforcer during the self-administration procedure, but conversely, when the response was reinforced by cocaine infusions, the same memantine doses significantly increased administrations (Newman and Beardsley, 2006).

When the NMDA or the AMPA receptors were blocked prior to the expression of the CPP, on the Post-C day, the preference was also abolished. Several reports have found that NMDA receptor blockade with MK-801 or L-701,324 does not affect the expression of the CPP (Cervo and Samanin, 1995; Kotliska and Biala, 1999), but other authors found that memantine administered jointly with cocaine in three conditioned trials prevented the acquisition and the expression of the CPP (Kotliska and Biala, 2000). Although the AMPA receptor antagonists have been less studied, it has been

found that DNQX impaired expression but not acquisition of cocaine-induced CPP (Cervo and Samanin, 1995). While for most of these authors, the NMDA receptors seem to be implicated in the primary rewarding properties of cocaine, the AMPA receptors only being important for the behaviour elicited by the stimuli previously associated with the drug action (CPP expression), our results suggest that both receptors are involved in the two aspects of the procedure.

As we have previously reported, a noncontingent injection of cocaine (half of the dose used for conditioning) was capable of reinstating the extinguished preference for the cocaine-paired compartment (Maldonado et al., 2006). On the contrary to the results obtained when memantine or CNQX were administered during the acquisition or expression of the CPP, when the animals had acquired the association of a distinctive environment with cocaine without any interference, neither of the glutamate antagonists blocked the reinstatement of the preference. Moreover, these antagonists in themselves did not show the ability to reinstate the preference, although the higher CNQX dose showed a tendency to increase the time spent in the cocaine-paired compartment, the mice showing divergent responses (expressed by the wide deviation of the data). Moreover, in the animals in which the acquisition or expression of the CPP was not impaired with the administration of memantine or CNQX, the reinstatement was not affected after a priming injection of cocaine.

There are no previous reports of the effects of glutamate antagonists on the reinstatement of the preference in an extinguished CPP. Self-administration studies have been mainly focused on the consequences of the blockade of AMPA receptors, but in one study performed with memantine, this drug administered prior to a priming injection of cocaine eliminated the difference between reinforcer and non-reinforcer-lever response rates, this effect being largely due to an increase in responding upon the non-reinforcer lever rather than to decreased reinforced-lever responding. In the same work, memantine did not abolish the selective increase in reinforced-lever responding induced by exposure to cocaine-related stimuli (Bespalov et al., 2000). Moreover, the NMDA receptor antagonist CGP 39551 failed to affect cue-induced cocaine self-administration (Bäckström and Hyttiä, 2006). Thus, the few studies performed to the moment do not indicate a specific role for NMDA receptors in the reinstatement of cocaine seeking behaviour, similar to the findings of the present work.

A more important role for the AMPA receptor is suggested, at least for its GluR1 subunit, which is believed to promote extinction. The procedure of extinction during withdrawal from chronic cocaine administration induces experience-dependent increases in the GluR1 and GluR2/3 subunits of the AMPA receptor in the N Acc shell, and particularly, increases in GluR1 are positively associated with the level of extinction achieved during training (Sutton et al., 2003). After being injected into the basolateral amygdala, CNQX blocked the reinstatement of cocaine self-administration after a priming dose (See et al., 2001). Likewise, CNQX in the N Acc blocked the reinstatement obtained by an intra-mPFC injection of cocaine (Park et al., 2002). Finally, in a recent report, systemic CNQX also attenuated cue-induced reinstatement of cocaine self-administration (Bäcktröm and Hyytiä, 2006). Differently from the NMDA, the AMPA receptor seems to be crucial for either cue- or priming-induced reinstatement of cocaine self-administration. Our results showed, on the contrary, that AMPA receptors do not play a critical role for cocaine-priming-induced reinstatement of the CPP.

In both human addicts and animal reinstatement models, a return to drug use can be precipitated by three distinct types of stimuli: exposure to an environmental stimulus that is strongly associated with the drug experience; exposure to a pharmacological stimulus that induces some component of the drug experience and; exposure to some stressors. Although all of these modalities of cue, drug prime and stress involve distinct subcircuits mediating stimulus perception, these subcircuits may converge onto a common circuit that mediates the initiation of drug-seeking behaviour (Kalivas and McFarland, 2003). There was — until recently — a consensus that accumbens dopamine activity mediates reinstatement induced by cocaine priming (Bossert et al., 2005). However, Kalivas and McFarland argue that cocaine-priming-induced reinstatement is mediated not by accumbens DA transmission, but by glutamatergic activation of accumbens (AMPA) receptors (Kalivas and McFarland, 2003). The authors hypothesized that cocaine-induced reinstatement results from activation of the VTA-dorsal prefrontal cortex DA pathway, leading to the activation of the dorsal prefrontal cortex-accumbens core glutamate pathway, and subsequent activation of the accumbens core-ventral pallidum pathway, presumably a GABAergic pathway (Kalivas and McFarland, 2003). Nevertheless, McFarland and Kalivas' hypothesis cannot

account for several recent findings. Cocaine-induced reinstatement is attenuated by basolateral amygdala lesions, antagonism of dopamine D1-like receptors in the basolateral amygdala or central amygdala, or reversible inactivation of the ventral subiculum by lidocaine (Alleweireldt et al., 2006, Sun and Rebec, 2003 and Yun and Fields, 2003). Furthermore, cocaine-priming-induced reinstatement is attenuated by infusions of a dopamine D1-like receptor antagonist (SCH 23390) into the accumbens shell, but not core (Anderson et al., 2003). In animals in which self-administration has been extinguished, a cocaine prime increases Fos expression primarily in brain regions receiving relatively dense dopaminergic innervation, this effect being indicative of the unconditioned pharmacological ability of cocaine to stimulate DA transmission (Neisewander et al., 2000). Thus, taking all these results together, we can argue that cocaine-induced reinstatement may be mediated by both dopaminergic and glutamatergic transmission in the accumbens and other mesocorticolimbic sites (Bossert et al., 2005).

It has to be taken into consideration that in the CPP paradigm the animals are not allowed to administer cocaine freely, as occurs in the self-administration paradigm, thus the reinstatement processes could be differently affected. After a cocaine-priming injection, increases in the release of prefrontal cortical glutamate in the N Acc was observed only in rats trained to self-administer cocaine, but not so in those yoked controls (McFarland et al., 2002). Maybe, with the conditions of our paradigm (cocaine is not freely administered and the use of a priming dose for the induction of reinstatement), the dopaminergic component would be stronger than that of the glutamatergic, thus the blockade of NMDA or AMPA receptors would be insufficient to abolish the reinstatement of the preference.

In previous studies performed in our laboratory, memantine modified several morphine effects. After chronic morphine administration, it decreased the tolerance and dependence, ameliorating the physical signs occurring in the naloxone-induced morphine withdrawal and blocking the induced aversion for the compartment paired with naloxone administration (Maldonado et al., 2003). In a recent series of studies, this NMDA antagonist blocked the acquisition and reinstatement of cocaine-induced preference after a priming dose of morphine in the CPP procedure (Ribeiro Do Couto et al., 2004, 2005). In these studies, the same memantine dose (20 mg/kg) was capable of

blocking both processes. On the contrary, in the present work, although memantine efficiently blocked acquisition and expression, it was incapable of altering drug-primed reinstatement of the preference. The nature of the different drugs studied (an opiate and a psychostimulant) could explain the different results obtained. However, there are no studies on the role of CNQX in morphine-induced CPP. In a recent study, we have found that 10 mg/kg of CNQX blocked the sensitization of the rewarding effects of morphine in CPP (in preparation).

Our results confirm that an essential dissociation exists between the circuitry mediating the reinforcing properties of a drug and the primed reinstatement of drug-seeking behaviour, evaluated by the CPP paradigm. The glutamatergic system plays a role in learning and memory and is also important for the reinforcing properties of drugs of abuse, thus, the present results give support to glutamate mediating the learned aspects of drug addiction, particularly in those involving control by environmental stimuli. The acquisition and expression of the association of a distinct environment with cocaine effects are dependent on NMDA and AMPA receptors, but, on the contrary, cocaine-priming-induced reinstatement seems be, at least partially, independent of these receptors. The present study points out that while memantine or AMPA antagonists may be useful treatments for cocaine seeking or craving invoked by environmental cues, its effect on cocaine's reinforcing properties are complex and more investigation of these compounds as a potential medication to aid in cocaine abuse disorders is necessary.

Acknowledgements

This research was supported by the following grants: Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Investigación and FEDER (Ref. SEJ2005-00316) and Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud "Carlos III" (FIS), Red de Trastornos Adictivos (G03/005) y Proyectos de Investigación (PI052165), Spain. We wish to thank Ms. Miriam Phillips for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

- Alleweireldt, A.T., Hobbs, R.J., Taylor, A.R. and Neisewander, J.L. (2006) Effects of sch-23390 infused into the amygdala or adjacent cortex and basal ganglia on cocaine seeking and self-administration in rats. *Neuropsychopharmacology*. 31, 363-374.
- Anderson, S.M., Bari, A.A. and Pierce, R.C. (2003) Administration of the D1-like dopamine receptor antagonist SCH-23390 into the medial nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*. 168, 132-138.
- Bäckström, P. and Hyytiä, P. (2003) Attenuation of cocaine-seeking behaviour by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX in rats. *Psychopharmacology*. 166, 69-76.
- Bäckström, P. and Hyytiä, P. (2006) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor antagonism attenuates cue-induced cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology*. 31, 778-786.
- Bell, K., Duffy, P. and Kalivas, P.W. (2000) Context-specific enhancement of glutamate transmission by cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 23, 335-344.
- Bespalov, A.Y., Dravolina, O.A., Zvartau, E.E., Beardsley, P.M. and Balster, R.L. (2000) Effects of NMDA receptor antagonists on cocaine-conditioned motor activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 303-311
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, 31-39.
- Blokhina, E.A., Kashkin, V.A., Zvartau, E.E., Danysz, W. and Bespalov, A.Y. (2005) Effects of nicotinic and NMDA receptor channel blockers on intravenous cocaine and nicotine self-administration in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15, 219-225.

Bossert, J.M., Ghitza, U.E., Lu, L., Epstein, D.H. and Shaham, Y. (2005) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications. *Eur. J. Pharmacol.* 526, 36-50.

Boudreau, A.C., Wolf, M.E. (2005) Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 25, 9144-9151.

Brabant, C., Quertemont, E. and Tirelli, E. (2005) Influence of the dose and the number of drug-context pairings on the magnitude and the long-lasting retention of cocaine-induced conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology.* 180, 33-40.

Capriles, N., Rodaros, D., Sorge, R.E. and Stewart, J. (2003) A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology.* 168, 66-74.

Cervo, L., Samanin, R. (1995) Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Res.* 673, 242-250.

Collins, E.D., Vosburg, S.K., Ward, A.S., Haney, M., Foltin, R.W. (2006) Memantine increases cardiovascular but not behavioral effects of cocaine in methadone-maintained humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 47-55.

Collins, E.D., Ward, A.S., McDowell, D.M., Foltin, R.W. and Fischman, M.W. (1998) The effects of memantine on the subjective, reinforcing and cardiovascular effects of cocaine in humans. *Behav. Pharmacol.* 9, 587-598.

Cornish, J.L. and Kalivas, P.W. (2000) Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J. Neurosci.* 20, RC89.

Cunningham, C.L., Dickinson, S.D., Grahame, N.J., Okorn, D.M. and McMullin, C.S. (1999) Genetic differences in cocaine-induced conditioned place preference in mice depend on conditioning trial duration. *Psychopharmacology*. 146, 73-80.

Harris, G.C. and Aston-Jones, G. (2003) Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharmacology*. 28, 73-76.

Hyttiä, P., Bäckström, P. and Liljequist, S. (1999) Site-specific NMDA receptor antagonists produce differential effects on cocaine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 378, 9-16.

Kalivas, P.W. (1995) Can EAA transmission play a ubiquitous role in drug-induced neural plasticity? Commentary on Stephens, 'A glutamatergic hypothesis of drug dependence: extrapolations from benzodiazepine receptor ligands' *Behav. Pharmacol.* 6, 452-454.

Kalivas, P.W. and McFarland, K. (2003) Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*. 168, 44-56.

Karler, R., Calder, L.D., Chaudhry, I.A. and Turkanis, S.A. (1989) Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.* 45, 599-606.

Kim, H.S., Park, W.K., Jang, C.G. and Oh, S. (1996) Inhibition by MK-801 of cocaine-induced sensitization, conditioned place preference, and dopamine-receptor supersensitivity in mice. *Brain Res. Bull.* 40, 201-207.

Kotlinska, J. and Biala, G. (1999) Effects of the NMDA/glycine receptor antagonist, L-701,324, on morphine- and cocaine-induced place preference. *Pol. J. Pharmacol.* 51, 323-330.

Kotlinska, J. and Biala, G. (2000) Memantine and ACPC affect conditioned place preference induced by cocaine in rats. *Pol. J. Pharmacol.* 52, 179-185.

Krebs, M.O., Desce, J.M., Kemel, M.L., Gauchy, C., Godeheu, G., Cheramy, A. and Glowinski, J. (1991) Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 56, 81-85.

Maldonado, C., Cauli, O., Rodriguez-Arias, M., Aguilar, M.A. and Miñarro, J. (2003) Memantine presents different effects from MK-801 in motivational and physical signs of morphine withdrawal. *Behav. Brain Res.* 144, 25-35.

Maldonado, C., Rodriguez-Arias, M., Castillo, A., Aguilar, M.A. and Miñarro, J. (2006) Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behav. Pharmacol.* 17, 119-131.

Maj, J., Rogoz, Z., Skuza, G. and Jaros, T. (1995) Some behavioral effects of CNQX and NBQX, AMPA receptor antagonists. *Pol. J. Pharmacol.* 47, 269-277

McFarland, K., Lapish, C.C. and Kalivas, P.W. (2002) Cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behaviour depends upon activation of a glutamate projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens. *Soc. Neurosci. Abstr.* 28, 897.12.

McFarland, K., Lapish, C.C. and Kalivas, P.W. (2003) Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J. Neurosci.* 23, 3531-3537.

Mueller, D. and Stewart, J. (2000) Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav. Brain Res.* 115, 39-47.

Neisewander, J.L., Baker, D.A., Fuchs, R.A., Tran-Nguyen, L.T., Palmer, A. and Marshall, J.F. (2000) Fos protein expression and cocaine-seeking behavior in rats after exposure to a cocaine self-administration environment. *J. Neurosci.* 20, 798-805.

Newman, J.L. and Beardsley, P.M. (2006) Effects of memantine, haloperidol, and cocaine on primary and conditioned reinforcement associated with cocaine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology*. 185, 142-149.

Park, W.K., Bari, A.A., Jey, A.R., Anderson, S.M., Spealman, R.D., Rowlett, J.K. and Pierce, R.C. (2002) Cocaine administered into the medial prefrontal cortex reinstates cocaine-seeking behavior by increasing AMPA receptor-mediated glutamate transmission in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 22, 2916-2925.

Pierce, R.C., Meil, W.M. and Kalivas, P.W. (1997) The NMDA antagonist, dizocilpine, enhances cocaine reinforcement without influencing mesoaccumbens dopamine transmission. *Psychopharmacology*. 133, 188-195.

Popik, P., Kozela, E., Wrobel, M., Wozniak, K.M., Slusher, B.S. (2003) Morphine tolerance and reward but not expression of morphine dependence are inhibited by the selective glutamate carboxypeptidase II (GCP II, NAALADase) inhibitor, 2-PMPA. *Neuropsychopharmacology*. 28, 457-467.

Pulvirenti, L. (2003) Glutamate neurotransmission in the course of cocaine addiction. In: Herman, B.H. (Ed), *Glutamate and Addiction*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 171-181.

Ranaldi, R., French, E. and Roberts, D.C. (1996) Systemic pretreatment with MK-801 (dizocilpine) increases breaking points for self-administration of cocaine on a progressive-ratio schedule in rats. *Psychopharmacology*. 128, 83-88.

Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M.A., Manzanedo, C., Rodriguez-Arias, M. and Minarro, J. (2004) Effects of NMDA receptor antagonists (MK-801 and memantine) on the acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 1035-1043.

Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M.A., Manzanedo, C., Rodriguez-Arias, M. and Minarro, J. (2005a) NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res. Bull.* 64, 493-503.

Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M.A., Rodriguez-Arias, M. and Minarro, J. (2005b) Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. *Brain Res.* 1050, 53-63.

Sanchez, C.J. and Sorg, B.A. (2001) Conditioned fear stimuli reinstate cocaine-induced conditioned place preference. *Brain Res.* 908, 86-92.

Scheggi, S., Mangiavacchi, S., Masi, F., Gambarana, C., Tagliamonte, A. and De Montis, M.G. (2002) Dizocilpine infusion has a different effect in the development of morphine and cocaine sensitization: behavioral and neurochemical aspects. *Neuroscience* 109, 267-274.

Seale, T.W. and Carney, J.M. (1991) Genetic determinants of susceptibility to the rewarding and other behavioral actions of cocaine. *J. Addict. Dis.* 10, 141-162.

See, R.E., Kruzich, P.J., Grimm, J.W. (2001) Dopamine, but not glutamate, receptor blockade in the basolateral amygdala attenuates conditioned reward in a rat model of relapse to cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology.* 154, 301-310.

Shalev, U., Grimm, J.W. and Shaham, Y. (2002) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol. Rev.* 54, 1-42.

Sun, W. and Rebec, G.V. (2003) Lidocaine inactivation of ventral subiculum attenuates cocaine-seeking behavior in rats. *J. Neurosci.* 23, 10258-10264.

Sutton, M.A., Schmidt, E.F., Choi, K.H., Schad, C.A., Whisler, K., Simmons, D., Karanian, D.A., Monteggia, L.M., Neve, R.L. and Self, D.W. (2003) Extinction-induced upregulation in AMPA receptors reduces cocaine-seeking behaviour. *Nature* 421(6918), 70-75.

Szumliński, K.K., Price, K.L., Frys, K.A. and Middaugh, L.D. (2002) Unconditioned and conditioned factors contribute to the 'reinstatement' of cocaine place conditioning following extinction in C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 136, 151-160.

Tzschentke, T.M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* 56, 613-672.

Ungless, M.A., Whistler, J.L., Malenka, R.C. and Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411, 583-587.

Vosburg, S.K., Hart, C.L., Haney, M. and Foltin, R.W. (2005) An evaluation of the reinforcing effects of memantine in cocaine-dependent humans. *Drug Alcohol Depend.* 79, 257-260.

Williams, J.M. and Steketee, J.D. (2004) Cocaine increases medial prefrontal cortical glutamate overflow in cocaine-sensitized rats: a time course study. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1639-1646.

Witkin, J.M. (1993) Blockade of the locomotor stimulant effects of cocaine and methamphetamine by glutamate antagonists. *Life Sci.* 53, PL405-10.

Wolf, M.E. (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog. Neurobiol.* 54, 679-720.

Yap, J.J., Covington, H.E., Gale, M.C., Datta, R. and Miczek, K.A. (2005) Behavioral sensitization due to social defeat stress in mice: antagonism at mGluR5 and NMDA receptors. *Psychopharmacology* 179, 230-239.

Yun, I.A., Fields, H.L. (2003) Basolateral amygdala lesions impair both cue- and cocaine-induced reinstatement in animals trained on a discriminative stimulus task. *Neuroscience* 121, 747-757.

Zhou, Y., Yuferov, V.P., Spangler, R., Maggos, C.E., Ho, A. and Kreek, M.J. (1998) Effects of memantine alone and with acute 'binge' cocaine on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 352, 65-71.

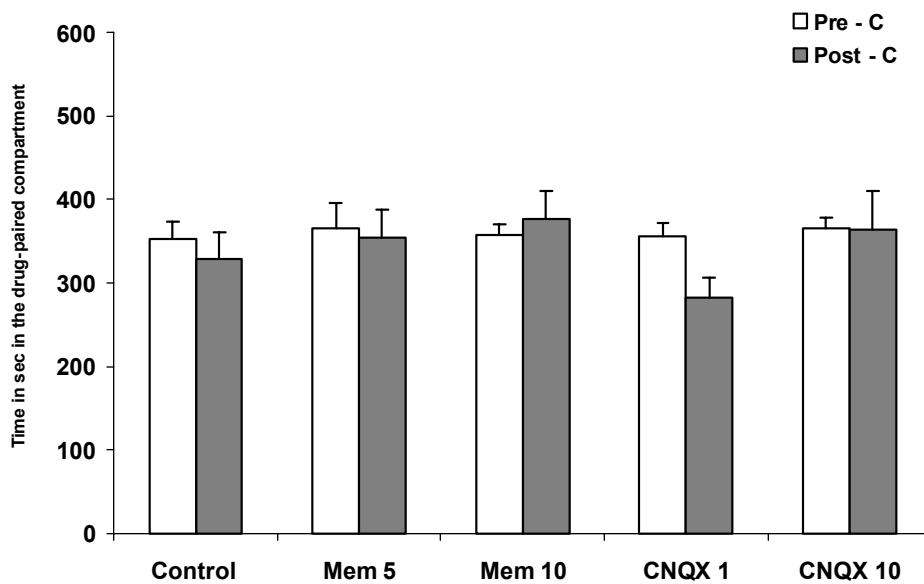


Figure 1. Effects of different doses of memantine and CNQX on the acquisition of CPP. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (\square), and after conditioning sessions (\blacksquare). During conditioning, animals were divided into the following treatment groups: C0, physiological saline (n=10); Mem 5, memantine 5 mg/kg (n=9); Mem 10, memantine 10 mg/kg (n=10); CNQX 1, CNQX 1 mg/kg (n=10); CNQX 10, CNQX 10 mg/kg (n=9).

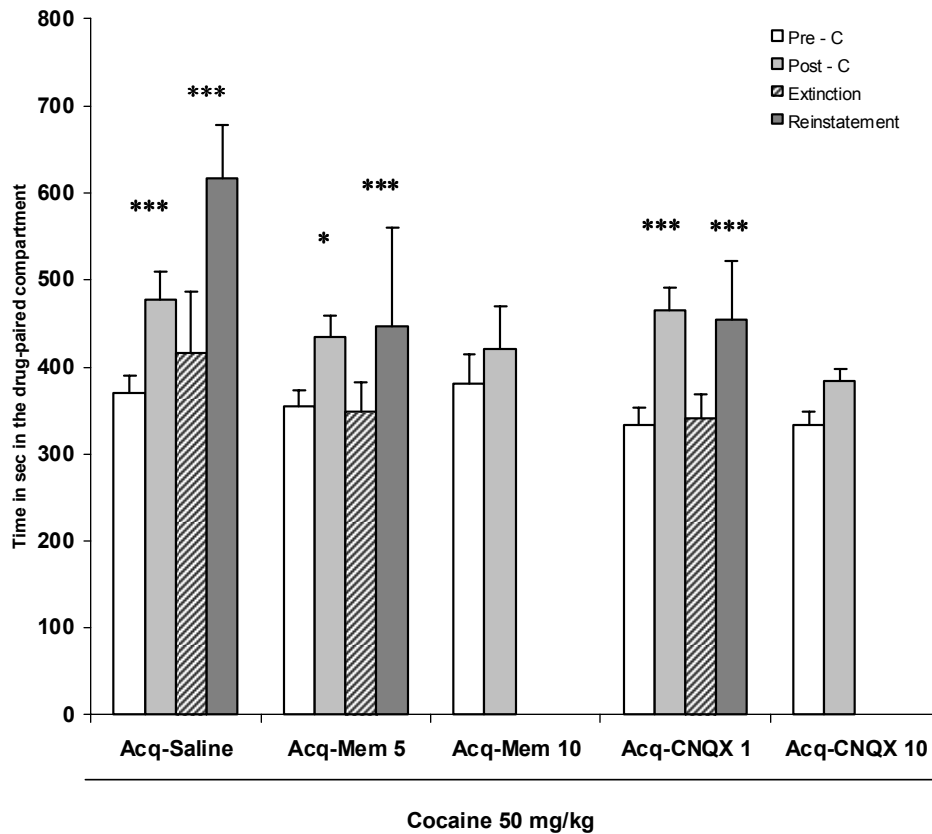


Figure 2. Effects of different doses of memantine and CNQX on the acquisition of CPP induced by 50 mg/kg of cocaine. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (\square), and after conditioning sessions (\blacksquare). Animals acquired the conditioning with 50 mg/kg of cocaine and the glutamate antagonists were divided into the following treatment groups: Acq-Saline, physiological saline (n=10); Acq-Mem 5, memantine 5 mg/kg (n=9); Acq-Mem 10, memantine 10 mg/kg (n=10); Acq-CNQX 1, CNQX 1 mg/kg (n=10); Acq-CNQX 10, CNQX 10 mg/kg (n=10). * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ significant difference in time spent in Post-C with respect to Pre-C sessions.

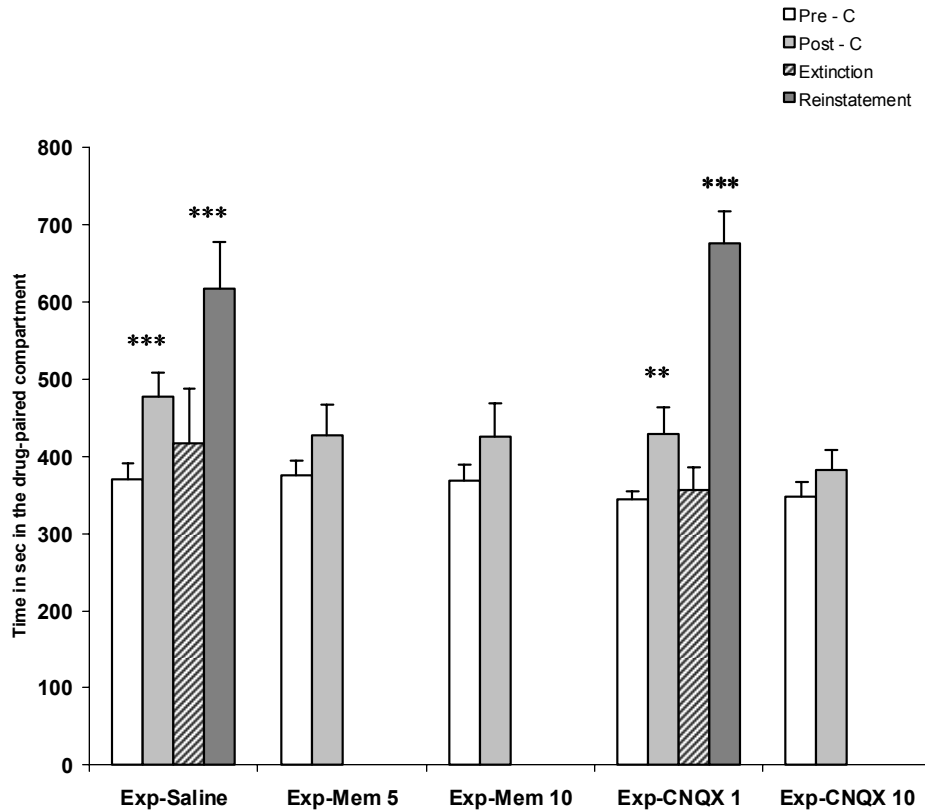


Figure 3. Effects of different doses of memantine and CNQX on the expression of CPP induced by 50 mg/kg of cocaine administered prior to the Post-C test. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (\square), and after conditioning sessions (\blacksquare). Animals acquired the conditioning with cocaine and on the Post-C day were divided into the following treatment groups: Exp-Saline, physiological saline (n=10); Exp-Mem 5, memantine 5 mg/kg (n=9); Exp-Mem 10, memantine 10 mg/kg (n=9); Exp-CNQX 1, CNQX 1 mg/kg (n=10); Exp-CNQX 10, CNQX 10 mg/kg (n=10). **p < 0.02, *** p < 0.001 significant difference in time spent in Post-C with respect to Pre-C sessions.

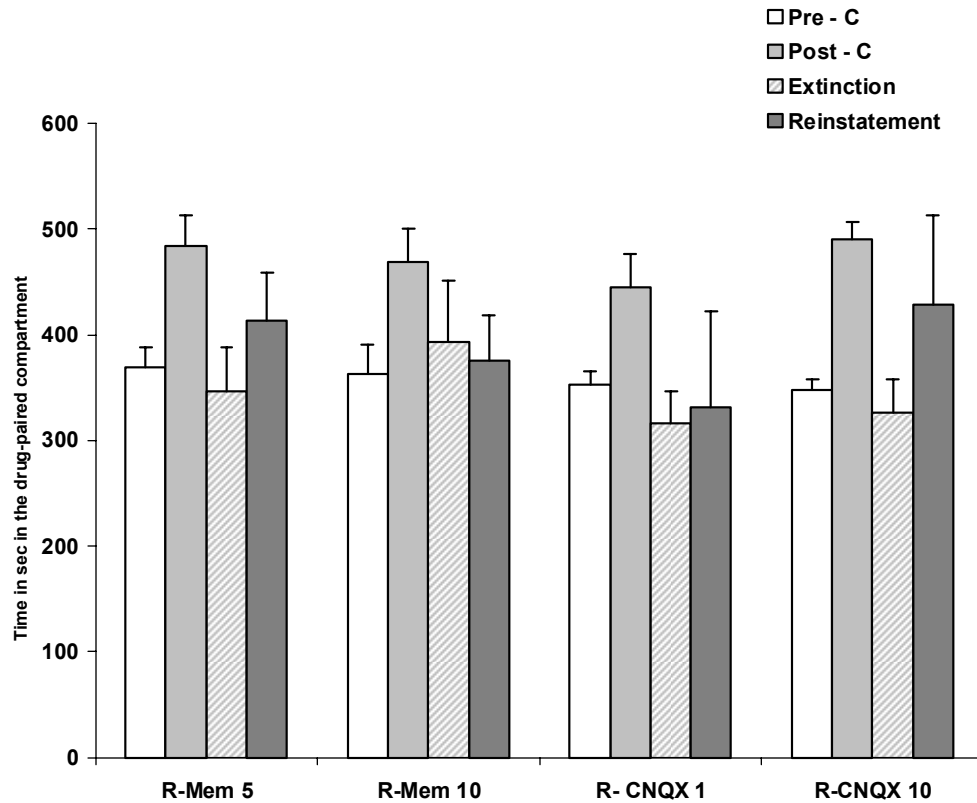


Figure 4. Effects of different doses of memantine and CNQX on the reinstatement of cocaine-induced CPP. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (\square), after conditioning sessions (\blacksquare), in the last extinction sessions (dashed lines), and in the reinstatement test (dark grey). After the conditioning and extinction procedures, animals were divided into the following treatment groups: R-Mem5, memantine 5 mg/kg (n=10); R-Mem 10, memantine 10 mg/kg (n=10); R-CNQX 1, CNQX 1 mg/kg (n=9); R-CNQX 10, CNQX 10 mg/kg (n=9).

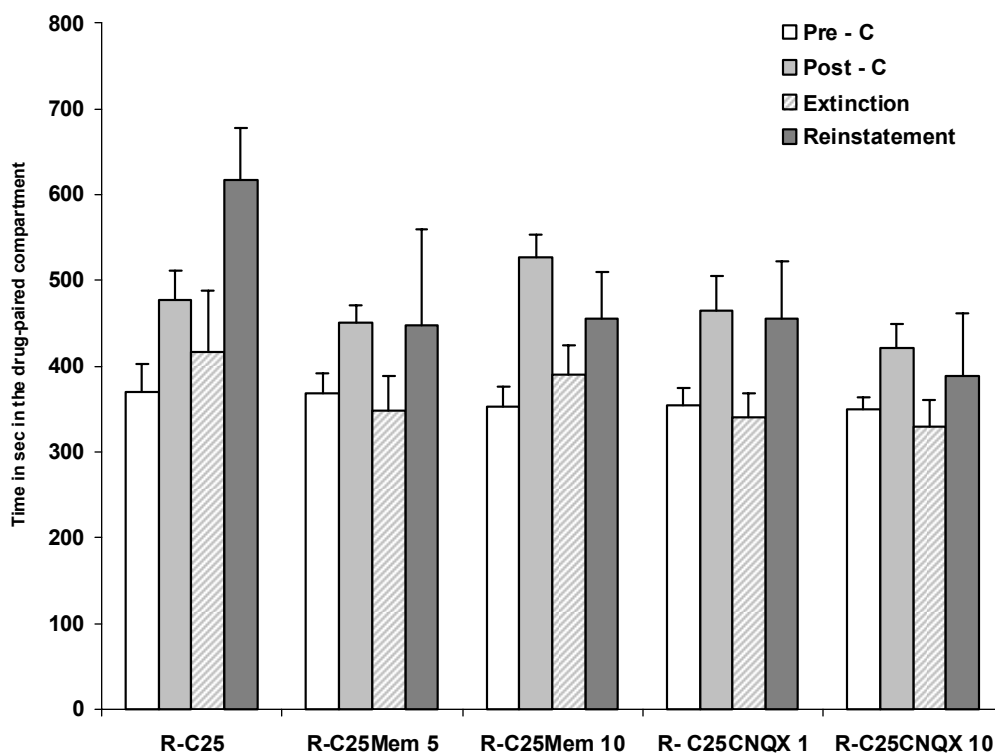


Figure 5. Effects of different doses of memantine and CNQX plus 25 mg/kg of cocaine on the reinstatement of cocaine-induced CPP. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (\square), after conditioning sessions (\blacksquare), in the last extinction sessions (dashed lines), and in the reinstatement test (dark grey). After the conditioning and extinction procedures, animals were divided into the following treatment groups: R-C25, physiological saline (n=10); R-C25Mem 5, memantine 5 mg/kg (n=10); R-C25Mem 10, memantine 10 mg/kg (n=10); R-C25CNQX 1, CNQX 1 mg/kg (n=9); R-C25CNQX 10, CNQX 10 mg/kg (n=8).

Estudio 4



Estudio 4: El GHB actúa de forma diferente sobre la actividad motora y las conductas sociales afectadas por las acciones de la morfina en ratones macho

Investigación original: C. Maldonado, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro (2003). GHB differentially affects morphine actions on motor activity and social behaviours in male mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 76: 259-265.

El ácido Gamma-hidroxibutírico (GHB) se encuentra de forma natural en el cerebro, siendo el GABA su principal precursor, sugiriéndose que el GHB podría actuar como neuromodulador o neurotransmisor en el cerebro de los mamíferos. Aunque principalmente afecta a las neuronas dopaminérgicas, también actúa sobre las sinapsis aminoacídicas detectándose su presencia en numerosas estructuras del cerebro de la rata como la corteza prefrontal, el hipocampo, la sustancia negra y el estriado, aunque no en concentraciones tan altas como las que pueden encontrarse en el cerebro humano. El GHB puede actuar sobre receptores de alta o baja afinidad. Cuando se administran dosis bajas, aparece una respuesta específica que está mediada solamente por los receptores específicos del GHB (alta afinidad), pero con dosis más altas, se obtiene también una respuesta sobre los receptores GABA_B (baja afinidad).

Aunque originalmente el GHB fue utilizado en anestesia y en el tratamiento de la narcolepsia, más recientemente se le ha otorgado un papel terapéutico en algunos tipos de drogodependencia. A dosis no hipnóticas, puede disminuir el deseo intenso (craving) por el alcohol o algunos de los síntomas del síndrome de abstinencia, tanto en adictos al alcohol como a la heroína. Además, un gran número de informes indican la creciente popularidad del GHB como droga recreacional.

Diversas investigaciones sugieren que el GHB podría tener relación con el sistema opiáceo endógeno. La dinorfina o la metencefalina aumentan tras la administración de GHB en estructuras tales como el estriado o la corteza frontal. Aunque se ha sugerido que algunos de los efectos del GHB se realizarían a través del sistema opiáceo, no se ha detectado ningún efecto de este sobre los receptores μ , δ y κ . El GHB y la morfina producen un número de efectos similares, sugiriéndose que la mayoría de los cambios inducidos por el GHB pueden ser mimetizados por un agonista opiáceo. Inversamente, el antagonista opiáceo naloxona puede revertir muchos de los efectos observados tras la administración de GHB. Ya que el GHB no parece actuar directamente sobre el sistema opiáceo, podría producir sus efectos alterando funcionalmente la actividad de la vía dopaminérgica. Tras una atenuación inicial de los niveles de la dopamina, el GHB aumenta la actividad de la tirosina hidroxilasa y estimula la liberación de dopamina.

La investigación que presentamos a continuación tiene como objetivo determinar los efectos del GHB sobre la actividad locomotora y la conducta social en ratones macho. También se estudió la influencia de este compuesto sobre los efectos producidos por la morfina en los comportamientos previamente mencionados. Inicialmente se evaluó el efecto de varias dosis de GHB sobre la actividad motora espontánea y la hiperactividad inducida por la morfina. En general se asume que la estimulación motora y los efectos de recompensa de las sustancias de abuso se encuentran relacionados. En concreto, un incremento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducido por la administración de una droga sería el responsable tanto de sus efectos motores como reforzantes. Posteriormente, se evaluaron los efectos de un amplio rango de dosis de GHB sobre los comportamientos sociales. Aunque el GHB se ha utilizado para mejorar los síntomas de abstinencia en los adictos al alcohol o a la heroína (situaciones que implican un incremento

de la irritabilidad o la agresividad), no se ha llegado a evaluar completamente la acción específica de este compuesto sobre la conducta agresiva. Por lo tanto, una dosis de morfina con conocidos efectos antiagresivos fue administrada junto con GHB para determinar la interacción de ambas drogas sobre el comportamiento social de los ratones.

En el primer experimento, para evaluar el efecto del GHB sobre la actividad motora espontánea, los animales fueron divididos en cinco grupos (suero fisiológico y 25, 100, 200 y 400 mg/kg de GHB). Otros animales fueron asignados a 10 grupos, la mitad de ellos recibió 10 mg/kg de morfina y el resto 50 mg/kg. Cuatro subgrupos de cada uno de estos últimos grupos mencionados también recibieron diversas dosis de GHB (25, 100, 200 y 400 mg/kg). La actividad locomotora de los animales fue evaluada utilizando un actímetro, que realizó un registro de la actividad durante una hora tras la administración de cada tratamiento.

Nuestros resultado indican que los grupos que reciben GHB junto con 50 mg/kg de morfina muestran una actividad locomotora significativamente mayor que el resto de grupos. Por otro lado, aparece una disminución significativa de la actividad motora, en los animales que recibieron la dosis mayor de GHB (400 mg/kg). En los grupos que recibieron 50 mg/kg de morfina junto con GHB, las dosis superiores a 100 mg/kg de GHB fueron capaces de bloquear la hiperactividad inducida por el agonista opiáceo.

En el segundo experimento, con el fin de evaluar los encuentros sociales, los animales experimentales fueron alojados individualmente durante 28 días y un mismo número de animales fueron agrupados de seis en seis para ser utilizados como oponentes “anónimos”. Los animales experimentales fueron divididos en 10 grupos en función del tratamiento recibido: suero fisiológico, diferentes dosis de GHB (25, 100, 200 ó 400

mg/kg), o una inyección de morfina (10 mg/kg) junto las mismas dosis de GHB (25, 100, 200 o 400 mg/kg). Veinte minutos después de administrar el fármaco, se procedió a realizar el test, donde un animal experimental y un oponente fueron enfrentados en un área neutral durante 10 minutos, permitiéndoles adaptarse al ambiente durante un minuto antes de comenzar la prueba. Los encuentros fueron grabados con una cámara de vídeo para su posterior análisis conductual. En dichos encuentros cuantificamos el tiempo que el animal experimental dedicaba a cada una de las siguientes categorías de conducta: aseo corporal, escarbar, exploración no social, exploración social, exploración desde una distancia, amenaza, ataque e inmovilidad. Además de estas conductas, también se midieron las latencias y el tiempo medio (tiempo total / número de eventos) de las conductas de ataque y de amenaza.

Tras la administración de la dosis más alta de GHB (400 mg/kg) los animales permanecían inmóviles durante todo el test, por lo que no se muestran estos resultados. En la conducta de escarbar, la administración de morfina, sola o junto con cualquier dosis de GHB disminuye el tiempo que los animales dedican a esta conducta en comparación con el grupo control. En la conducta de exploración no social, los animales que recibieron 25 o 100 mg/kg de GHB junto con morfina, mostraron un incremento de esta conducta con respecto al grupo control y con respecto a aquellos grupos que recibieron únicamente la misma dosis de GHB. En todas las categorías relacionadas con la conducta de amenaza (amenaza, número de amenazas y latencia) se observa un efecto aditivo cuando se administra la morfina junto con cualquier dosis de GHB, efecto que no se aprecia cuando administramos por separado ambas sustancias. En la conducta de ataque, todos los grupos (excepto GHB 25 y GHB 100 mg/kg) muestran una disminución significativa del tiempo dedicado a esta conducta en comparación con el grupo control. La unidad de ataque disminuyó en los grupos que recibieron morfina, sola o junto a cualquier dosis de GHB. La

latencia de ataque es mayor en los grupos que reciben GHB (dosis igual o superior a 100 mg/kg), morfina o ambas drogas.

En este estudio, el GHB ejerce una influencia sobre los efectos de la morfina que dependerá de la conducta estudiada. Aunque el GHB reduce la actividad motora espontánea únicamente con las dosis más altas, contrarresta de modo eficaz la hiperactividad inducida por la morfina. El GHB redujo la agresión, potenciando las acciones antiagresivas de la morfina y aumentando la conducta social sin afectar la actividad motora. Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que existe una relación entre los sistemas GHBérgico y el opiáceo, sugiriendo que esta interacción dependerá del comportamiento evaluado.

La administración de GHB disminuye la actividad motora con dosis iguales o superiores a 200 mg/kg, coincidiendo estos resultados con los observados por otros investigadores. Por otra parte, no se observó hiperactividad tras su administración, tal como han descrito otros autores. Los efectos del GHB sobre la actividad motora pueden ser explicados por sus acciones sobre el sistema dopaminérgico. Parece que el sistema GHBérgico participa en el control de la neurotransmisión dopaminérgica, principalmente reduciendo la actividad en las vías nigroestriatal y mesocorticolímbica. La atenuación de la neurotransmisión dopaminérgica podría ser la base de los efectos del GHB sobre la actividad motora.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la administración de 50 mg/kg de morfina induce una clara hiperactividad motora en ratones. Cabe señalar que, a excepción de la dosis más baja (25 mg/kg), el GHB (incluso con dosis que no disminuyen la actividad motora por sí mismas), ha sido capaz de contrarrestar la hiperactividad inducida por la morfina, sugiriendo este hecho un papel específico de los receptores del GHB en esta acción de la morfina. Las

neuronas dopaminérgicas mesolímbicas son necesarias para la expresión de la hiperactividad inducida por los opiáceos, siendo probable que el GHB ejerza su acción sobre este sistema, bloqueando la hiperactividad inducida por el opiáceo. La acción del GHB sobre el sistema dopaminérgico sugiere un bloqueo más fuerte de esta hiperactividad inducida morfina. Se ha sugerido que la liberación de opiáceos endógenos inducida por el GHB podría reforzar la hiperactividad provocada por la morfina, pero nuestros resultados sugieren que el efecto que el GHB ejerce sobre el sistema dopaminérgico parece más crítico en la expresión de este comportamiento.

En los encuentros sociales, la administración de 200 mg/kg de GHB disminuye significativamente las conductas de amenaza y de ataque sin deteriorar la actividad motora. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, aunque utilizando dosis más bajas (100 y 120 mg/kg). Si bien la misma cepa de ratones se utilizó en ambos estudios, la mayor agresividad observada en los animales de nuestro trabajo puede explicar la necesidad de utilizar dosis más altas para alcanzar una acción antiagresiva. La disminución de la agresión observada tras la administración de GHB apoya la bien conocida acción antiagresiva de los antagonistas dopaminérgicos en roedores, especialmente en ratones. Según hemos mencionado previamente, el GHB puede modular la neurotransmisión dopaminérgica actuando bien sobre los receptores GHB o los GABA. El hecho de que con las dosis bajas, que producen un bloqueo más específico de los receptores GHB, no se afecten los comportamientos agresivos o sociales de los ratones, sugeriría que los receptores GHB no son los principales responsables de las acciones antiagresivas de este fármaco. A dosis más altas, la ocupación y la activación del receptor GABA_B puede desempeñar un papel más importante, ya que la activación del sistema GABA reduce la agresión tanto en animales como en seres humanos.

Tras la administración de 200 mg/kg de GHB se observa un aumento en el tiempo que los animales dedican a las conductas de investigación social (contacto social). Se ha observado una acción ansiolítica del GHB en ratas utilizando otros paradigmas, tales como el laberinto elevado (plus-maze), siendo este efecto atribuido a una acción sobre el complejo receptor de las benzodiazepinas en el GABA_A. Aunque los efectos antiagresivos del GHB son similares al perfil de comportamiento de los antagonistas dopaminérgicos D₂, este efecto social se observa solamente tras la administración de los antagonistas del receptor D₃.

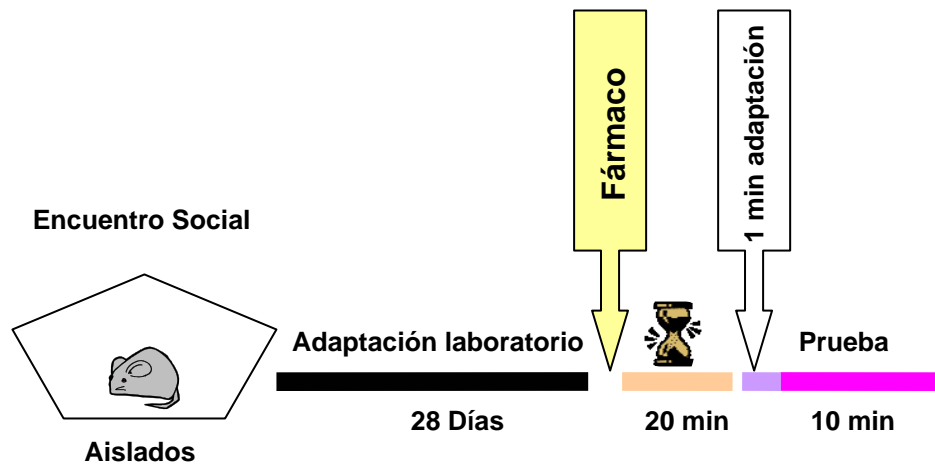
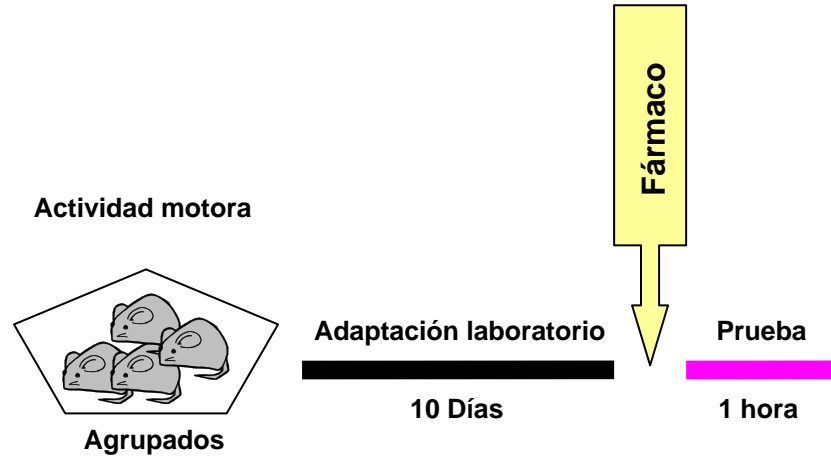
El GHB y los opiáceos tienen una clara relación, ya que los efectos del GHB en animales pueden ser imitados por los agonistas del receptor opiáceo y bloqueado por los antagonistas de estos mismos receptores. Además, el GHB libera opiáceos endógenos tales como la proencefalina. Puesto que el GHB no se une a los receptores opiáceos ni la naloxona se une a los receptores GHB, esta interrelación podría depender de la acción del GHB sobre la dopamina u otros sistemas de neurotransmisión, como el GABAérgico. Numerosos estudios indican la existencia de una relación entre las funciones GABAérgicas y opioides. El GABA puede modificar diferentes efectos farmacológicos inducidos por la morfina, tales como la liberación de diferentes hormonas, la catalepsia o la analgesia. Es particularmente importante el papel que juega el GABA en la dependencia a los opiáceos, ya que se ha demostrado que la administración de este neurotransmisor afecta el desarrollo de la tolerancia y de la dependencia a la morfina.

Se ha propuesto una acción similar entre el GHB y los antagonistas dopaminérgicos, específicamente los antagonistas D₂, que no afectan a la actividad motora. Nuestros resultados confirman que el GHB tiene un perfil conductual similar al raclopride o al sulpiride cuando se evalúa durante los encuentros sociales. Sin embargo, esta similitud no se observa cuando se

estudia administrándolo conjuntamente con la morfina. La morfina incrementa el efecto inmovilizador del haloperidol pero contrarresta sus acciones antiagresivas. Por lo tanto, aunque el GHB presenta un perfil conductual similar a los antagonistas DA, su interacción con el sistema opiáceo parece ser completamente diferente.

En conclusión, los resultados presentados confirman y amplían el conocimiento acerca de la interacción entre el sistema opiáceo y el GHB. Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto la existencia de una disociación entre los efectos antiagresivos y motores de los opiáceos, y de los antagonistas dopaminérgicos. Esta disociación también ha sido observada en el presente estudio cuando la morfina fue administrada conjuntamente con el GHB. Este fármaco potencia los comportamientos sociales afectados por la morfina pero contrarresta el incremento de la actividad motora inducido por la morfina. Estos resultados junto a los obtenidos en los estudios realizados con los antagonistas dopaminérgicos, sugieren la existencia de diferentes vías neurobiológicas que controlan las conductas sociales y motoras.

PROTOCOLO DE ADMINISTRACION



GHB differentially affects morphine actions on motor activity and social behaviours in male mice

C. Maldonado, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro*

Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Aptdo. 22109, 46071 Valencia, Spain

Received 26 February 2003; received in revised form 23 July 2003; accepted 31 July 2003

Abstract

There are several reports suggesting that gamma-hydroxybutyric acid (GHB) influences the endogenous opioid system. The present study aimed to investigate the effects of GHB on motor and social activities and to examine its influence on morphine's actions on these behaviours. In a first experiment, several doses of GHB were studied but only the highest (200 and 400 mg/kg) produced a decrease in spontaneous motor activity measured in an actimeter cage. When hyperactivity induced by injecting 50 mg/kg of morphine was evaluated, all the GHB doses efficiently counteracted this morphine action. Using the paradigm of isolation-induced aggression, administration of 200 mg/kg of GHB significantly decreased threat and attack without impairing motor activity and, in addition, increased time spent in social contact. GHB increased morphine's suppression of threat or nonsocial exploratory behaviours. In conclusion, the interaction between GHB and the opioid systems was confirmed, with the drug having an additive effect on morphine-affected social behaviours but counteracting morphine-induced increases in motor activity.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: GHB; Morphine; Motor activity; Aggression; Social contacts; Mice

1. Introduction

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) naturally occurs in the brain, with GABA being its major precursor (Maitre, 1997; Nicholson and Balster, 2001). A role for GHB as a neuromodulator or neurotransmitter in the mammalian brain has been suggested (Vayer et al., 1987). Although it mainly affects dopaminergic neurons, it also acts on aminoacidergic synapses and the anterior part of the CNS, such as the striatum or the prefrontal cortex (Maitre, 1997). In rats, it has been detected in the frontal cortex, hippocampus, striatum or substantia nigra, although not in concentrations as high as those found in the human brain (Maitre, 1997). GHB presents two classes of binding sites (high and low affinity). When used at low doses, a specific response mediated only by GHB receptors occurs, but at a higher dosage, a GABA_b response is obtained. This GABAergic response could be induced either by GHBergic control of GABA release or probably by the synthesis of GABA from GHB (Maitre, 1997).

Although GHB was originally used in anaesthesia (Laborit et al., 1962) and in the treatment of narcolepsy (Broughton and Mamelak, 1979), more recently, a role for GHB in drug dependence has been hypothesized. At non-hypnotic doses, it may decrease alcohol craving (Gallimberti et al., 1992) or the withdrawal syndrome in both alcohol (Gallimberti et al., 1989) and heroin addicts (Gallimberti et al., 1993, 1994). Furthermore, an increasing number of reports have indicated the growing popularity of GHB as a recreational drug (Stell and Ryan, 1996).

GHB reportedly has a relationship with the endogenous opioid system. Dynorphine or met-enkephalin are increased after GHB administration in structures such as the striatum or frontal cortex (Lason et al., 1983; Gobaille et al., 1994; Schmidt-Mutter et al., 1999). Although it has been suggested that GHB could mediate some of its effects by potentiating some neural opioid mechanisms (Maitre, 1997), no effects on μ -, δ - and κ -opioid receptors have been detected (Feigenbaum and Simantov, 1996). In addition, GHB and morphine induce a number of similar effects, and it has been suggested that most changes induced by GHB can be mimicked by the opiate agonist (Snead and Bearden, 1980, 1982). Conversely, the opiate antagonist naloxone can reverse many of the effects observed after GHB administration

* Corresponding author. Tel.: +34-96-386-44-20x56293; fax: +34-96-386-46-68.

E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).

(Snead and Bearden, 1980; Vayer et al., 1987; Vayer and Maitre, 1989). As GHB does not seem to act directly on the opiate system, it may induce its effects by functionally altering activity of the dopaminergic pathways (Manier et al., 1991; Tang et al., 1983). After an initial attenuation of dopamine levels (Gessa et al., 1966), GHB enhances tyrosine hydroxylase activity and stimulates dopamine release (Morgenroth et al., 1976; Spano et al., 1971).

The present study aimed to determine the effects of GHB on motor and social activities in mice. The influence of this compound on the effects produced by morphine in the previously mentioned behaviours was also studied. The effect of several doses of GHB on spontaneous motor behaviour and on morphine-induced hyperactivity was initially evaluated in male mice. It is generally assumed that the motor stimulant and rewarding effects of drugs of abuse are homologous (Wise and Bozarth, 1987). In concrete, an increase in dopamine release in the nucleus accumbens induced by drug administration causes its motor and rewarding effects (Di Chiara and Imperato, 1988). Subsequently, the effects of a wide range of doses of GHB on social behaviours were assessed. Although GHB has been used to ameliorate the withdrawal symptoms of alcohol or heroin addicts (situations involving an increased irritability or aggressiveness), no specific actions of this drug on aggression have been fully evaluated. Therefore, a known antiaggressive dose of morphine was coadministered with GHB to assess the interaction of these drugs on mouse social behaviour.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Male mice of the OF1 strain (Charles River, Barcelona) were used for the locomotor study (159) and the social interaction test (138). The animals were aged 42 days on arrival at the laboratory and were housed under standard conditions with constant temperature (21 ± 2 °C), a reversed light schedule (white lights on 19:30–07:30 h), and food and water available ad libitum (except during the behavioural test). Animals for locomotor studies and half of those used for the social test (standard opponents) were group housed (four per cage of $28 \times 28 \times 14.5$ cm). Experimental and control animals for social studies were housed in isolation, one per cage (size $23 \times 13.5 \times 13$ cm). Procedures involving mice and their care conformed to national, regional and local laws and regulations, and are in accord with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.2. Drugs

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), and morphine hydrochloride (Laboratorios Alca-

liber, Madrid) were used in these experiments. Both compounds were diluted in physiological saline (0.9% NaCl), which was used as vehicle. A constant volume of drug (10 ml/kg) was injected, the needle being 0.5 mm in diameter and 16 mm in length.

2.3. Procedure and apparatus

After 10 days of adaptation to the laboratory, animals were divided into different groups. In the first experiment to test the effect of GHB on spontaneous motor activity, the animals were divided into five groups ($n=8$). Four of which received different doses of GHB (25, 100, 200 and 400 mg/kg) and the controls, which received physiological saline only. Other animals were allocated to 10 groups, half receiving 10 and the others 50 mg/kg of morphine. Four subgroups from each of these latter groups also received different doses of GHB (25, 100, 200 and 400 mg/kg). Immediately after drug administration, all animals were placed into the activity cages for 1 h. An actimeter composed of eight cages ($33 \times 15 \times 13$ cm), each with eight infrared lights located in a frame around the cage (distance 2 cm each side), was used to measure spontaneous locomotor activity (CIBERTEC, Spain). Each beam was separated by 2 cm, and was positioned on the horizontal axis, a little higher than the bottom of the cage (body level of mice). The different frames are separated from each other by 4 cm, and since they are opaque, animals cannot see other conspecifics.

In the second experiment, half of the experimental animals were housed individually for 28 days, and the other half (“standard opponents”) was housed in groups of six. Opponents were made temporarily anosmic by intranasal lavage with 4% zinc sulphate solution 1 day before testing (Smoothy et al., 1986). Behaviour was evaluated 20 min after drug administration. Tests consisted of an experimental animal and a standard opponent confronting each other in a neutral cage ($61 \times 30.5 \times 36$ cm) for 10 min, with 1 min of adaptation before the encounter. All tests were carried out under white illumination between the second and fifth hour of the dark phase of the light/dark cycle and were videotaped. The videotapes were analysed using a PC computer and a custom-developed programme (Brain et al., 1989) that facilitated estimation of times allocated to different broad functional categories of behaviour. The study of aggression using laboratory animals has to take into consideration behavioural patterns. The advantage of an ethological approach is that it analyses diverse categories of behaviour, each one consisting of temporally and sequentially organized communicative signals, acts and postures. This kind of analysis also takes into account proximal and triggering antecedents and consequences, each serving different functions (Miczek et al., 2002). In this work, the following behaviours were studied: body care, digging, nonsocial exploration, explore from a distance, social investigation, threat, attack and immobility. A more detailed description of these elements can be found in Rodríguez-Arias et al. (1998).

In addition to these behaviours, latencies and unit of attack and threat (total time of behaviour/number of events) were measured.

2.4. Statistical analyses

Motor activity data were analysed using analysis of variance (ANOVA) with one “within” and two “between” factors. Within factor was the time of recording (hour), with six levels (6 h). Between factors were: factor 1, GHB alone or with morphine (Groups), with three levels (GHB alone; GHB+Morphine 10; and GHB+Morphine 50); factor 2, dose of GHB (Treatment), with five levels (GHB0, GHB25, GHB100, GHB200 and GHB400).

Data of the social encounters were initially analysed using the Kruskal–Wallis test. For the behavioural categories in which this test was significant, differences between groups were examined using the two-tailed Mann–Whitney *U* test. This kind of statistical analysis has been previously used in other studies evaluating aggressive behaviour (Redolat et al., 1991; Rodríguez-Arias et al., 1997, 1999, 2002; Kudryavtseva et al., 1999).

3. Results

3.1. Motor activity

ANOVA reveals significant effect of Group [$F(2,105)=28.597$; $P<.001$]. Newman–Keuls Post hoc analysis showed

that locomotor activity was significantly higher ($P<.01$) in the group that received GHB plus 50 mg/kg of morphine in comparison with the others (see Fig. 1). ANOVA revealed significant effects of Treatment [$F(4,105)=2.665$; $P<.03$]. Newman–Keuls Post hoc analysis showed that locomotor activity was significantly lower ($P<.05$) in the groups that received the highest GHB dose (400 mg/kg) when compared with controls. ANOVA revealed significant effects of Hour [$F(5,525)=12.036$; $P<.001$]. Newman–Keuls Post hoc analysis indicated that locomotor activity was significantly lower ($P<.01$) in the first, fifth and sixth hour when compared with the second, third and fourth.

Interactions of Group/Hour [$F(10,525)=14.755$; $P<.001$], Treatment/Hour [$F(20,525)=4.155$; $P<.001$] and Group/Treatment/Hour [$F(40,525)=3.088$; $P<.001$] were significant but not so for Group/Treatment interaction [$F(8,105)=1.173$; $P<.3226$].

In the first group (GHB alone), the higher doses (200 and 400 mg/kg) produced a decrease in motor activity during the first and fifth hours ($P<.05$), the dose of 200 mg/kg also inducing an impairment during the third and fourth hour ($P<.05$). In the second group (Mor10+GHB), no differences were observed at any moment. In the third group (Mor50+GHB), doses of GHB up to 100 mg/kg were capable of blocking morphine-induced hyperactivity during the first hour ($P<.01$ for Mor50+GHB400 and Mor50+GHB200 and $P<.05$ for Mor50+GHB100), this effect only being observed for Mor50+GHB400 during the second hour ($P<.05$). In the last hour of recording, this group (Mor50+GHB400)

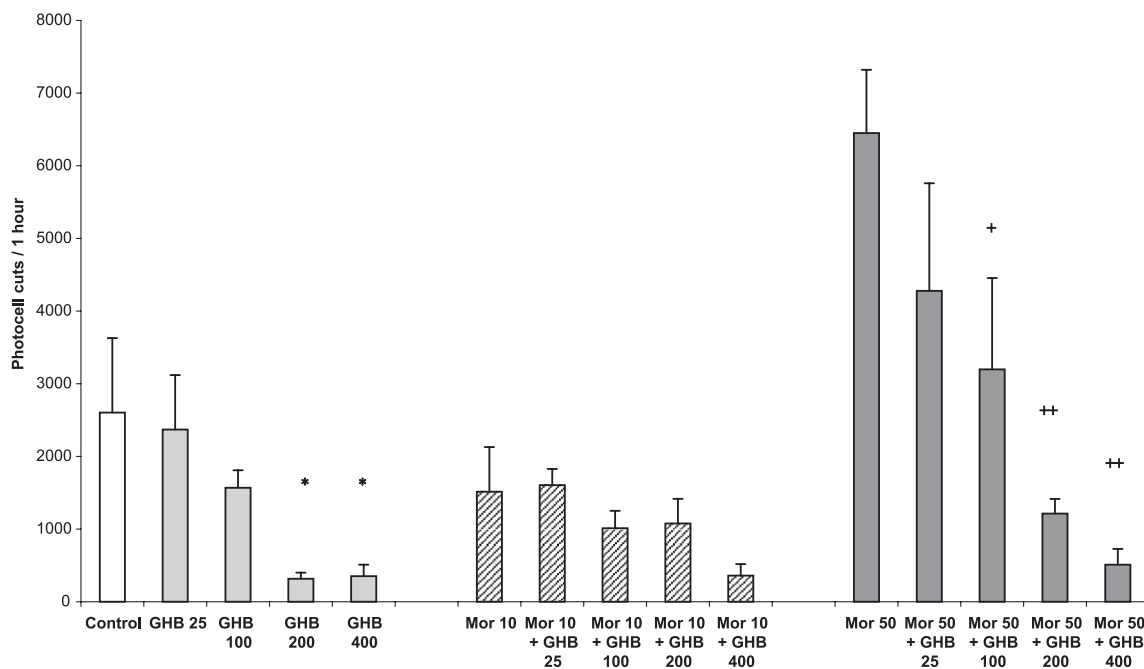


Fig. 1. Means (\pm S.E.M.) of locomotor activity in activity counts in 1 h shown for 15 groups of mice receiving saline or four different doses of GHB (25, 100, 200 and 400 mg/kg), 10 mg/kg of morphine, or four different doses of GHB (25, 100, 200 and 400 mg/kg) plus the same morphine dose, and 50 mg/kg of morphine, or four different doses of GHB (25, 100, 200 and 400 mg/kg) plus the latter morphine dose. Differences with respect to control group, * $P<.05$; differences with respect to Mor50 group, + $P<.05$; ++ $P<.02$.

presented a rebound activity in comparison to the rest of the groups ($P < .05$).

When we compare the treatment groups, in those that did not receive any dose of GHB, administration of 50 mg/kg of morphine induced hyperactivity during the first three hours ($P < .01$) in comparison with control or Mor10. During the fourth and fifth hours, Mor10 animals decreased their motor activity in comparison with controls ($P < .05$). Among the animals that received 25 or 100 mg/kg of GHB, hyperactivity was observed during the second hour in those also receiving 50 mg/kg of morphine. The decrease in motor activity shown by animals receiving only 200 mg/kg of GHB was counteracted by morphine administration ($P < .05$) during the first hour. During the two following hours (second and third), hyperactivity was presented in animals which received this GHB dose and 50 mg/kg of morphine. During the third, fourth and fifth hours, administration of 50 mg/kg of morphine plus 400 mg/kg of GHB induced hyperactivity in comparison with GHB administered alone or GHB plus 10 mg/kg of morphine.

3.2. Effects on social activities of GHB alone and in combination with morphine

The highest GHB dose (400 mg/kg) completely abolished behaviour of the animals: they became immobile for most of the time, thus the data are not shown. For the rest of treatment groups, only the most important results (see Table 1) are detailed.

The Kruskal–Wallis test showed significant ($P < .001$) treatment effect on *digging* behaviour. Administration of morphine alone or with any GHB (<400 mg/kg) dose decreased digging in comparison with saline-treated animals ($P < .02$ for Mor10+GHB 200 and $P < .002$ for the rest).

The Kruskal–Wallis test showed a significant treatment effect ($P < .001$) on *nonsocial exploration*. Animals receiving 25 or 100 mg/kg of GHB in addition to morphine showed a significant increase when compared to controls

and groups which received only the corresponding GHB doses ($P < .002$ in all cases).

For *social investigation*, the Kruskal–Wallis test ($P < .005$) showed a significant treatment effect. Animals receiving 200 mg/kg of GHB presented an increase in this behaviour when compared to those treated with saline ($P < .05$).

In any of the behaviours studied related to threat (*threat*, *number of threats* and *threat latency*), differences between groups were observed (Kruskal–Wallis test, $P < .001$ in all cases). On all measures, an additive effect was observed when morphine was coadministered with any GHB dose. Alone, neither was capable of diminishing threat, but the joint administration abolished all threat measures ($P < .02$ for MOR+GHB25 and MOR+GHB100, and $P < .002$ for MOR+GHB 200).

In any of the behaviours studied related to attack (*attack*, *unit of attack* and *attack latency*), differences between groups were observed (Kruskal–Wallis test, $P < .01$ for attack and $P < .001$ for the rest). All groups (except GHB25 and GHB100) showed a significant decrease in attack with respect to controls ($P < .02$ for Mor10 and $P < .002$ for the rest). Unit of attack was only decreased with morphine, alone or with any GHB dose ($P < .002$). Attack latency was longer with GHB 100 mg/kg onwards ($P < .05$ for GHB100, $P < .02$ for GHB200), morphine alone or plus any GHB dose ($P < .02$ for Mor10 and $P < .002$ for the rest).

4. Discussion

In this study, GHB influenced morphine effects in different ways depending on the behaviour studied. Although GHB administered alone reduced spontaneous motor activity only at high doses, it efficiently counteracted morphine-induced hyperactivity. Moreover, GHB reduced aggression and increased social behaviours in male mice

Table 1
Means of accumulated times (in seconds) with SEN allocated to different categories of behaviour

	Control	GHB25	GHB100	GHB200	Mor10	M+GHB25	M+GHB100	M+GHB200
Body care	8.5 ± 2.2	11.2 ± 3.9	8 ± 2	7.6 ± 3.2	15.6 ± 5.1	9.4 ± 2	14.1 ± 2.7	7.5 ± 3.4
Digging (a)	17.5 ± 4.8	6.2 ± 1.4 **	9.1 ± 2.8	20.7 ± 10.6	1.8 ± 1.4 ***	2 ± 1.5 ***	1 ± 0.5 ***	9.4 ± 6.2 **
Non social exploration (a)	421 ± 14	390 ± 28	457 ± 16	311 ± 61	490 ± 28	525 ± 18 ***	551 ± 10 ***	347 ± 78
Explore from a distance	14.5 ± 3	23.4 ± 2.2	12.2 ± 2.2	17.5 ± 4.6	18.5 ± 6.5	15.1 ± 2.5	13.5 ± 4	11.8 ± 3.9
Social investigation (a)	6.9 ± 3.4	16 ± 6.3	9.6 ± 5.6	36.4 ± 11.2 *	1.1 ± 0.7	4.3 ± 2.4	0.8 ± 0.8 *	15.8 ± 6.2
Threat (a)	30.5 ± 5.9	42 ± 13.2	25.4 ± 3.9	22.3 ± 10.1	26.4 ± 10.8	8.5 ± 5.5 **	12 ± 7.2 **	3.7 ± 3.2 ***
Unit of threat (a)	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.4 ± 0.2 **	0.6 ± 0.4 **	0.2 ± 0.2 ***
Threat latency (a)	27 ± 13	83 ± 60	161 ± 68	311 ± 100	371 ± 90	496 ± 68 **	479 ± 70 **	564 ± 38 ***
Attack (b)	102 ± 11.9	115 ± 29	76 ± 17	28.8 ± 11 **	42 ± 19.5 ***	14 ± 10 ***	3 ± 2 ***	0 ± 0.1 ***
Unit of attack (a)	3.2 ± 0.4	3.9 ± 0.7	3 ± 0.5	2.6 ± 0.8	2.3 ± 0.6 **	0.7 ± 0.5 ***	0.8 ± 0.5 ***	01 ± 0.1 ***
Attack latency (a)	26 ± 13	88 ± 60	174 ± 67 *	327 ± 95 **	403 ± 91 **	506 ± 67 ***	519 ± 48 ***	573 ± 28 ***
Immobility	0 ± 0	0 ± 0	7 ± 6	181 ± 89	5 ± 3	15.2 ± 15.2	7.6 ± 3.5	168 ± 85

Kruskal–Wallis test shows significant variance at (a) $P < .001$, (b) $P < .01$.

* Differs on two-tailed Mann–Whitney U test from control group, $P < .05$.

** Differs on two-tailed Mann–Whitney U test from control group, $P < .02$.

*** Differs on two-tailed Mann–Whitney U test from control group, $P < 0.002$.

without affecting motor activity, not suppressing but even potentiating morphine actions on aggression. Thus, present results supported the claimed relationship between the GHBergic and the opiate systems and suggest that this interaction depends on the behaviour evaluated.

Administration of GHB decreased motor activity at doses of 200 mg/kg and upwards, these results supporting others found in mice (Zerbib et al., 1992; Schmidt-Mutter et al., 1998; Cook et al., 2002; Itzhak and Ali, 2002). In addition, hyperactivity was not observed at any time after administration, although it has been reported by other authors (Zerbib et al., 1992; Schmidt-Mutter et al., 1998). The effects of GHB on motor activity can be explained by its actions on the DAergic system (Banvides et al., 1982; Fattore et al., 2000). The GHBergic system seems to participate in the control of the DAergic neurotransmission, mainly by reducing impulse flow in the nigrostriatal and in the meso-corticolimbic pathways (Roth et al., 1980; Nissbrandt et al., 1994). The attenuation of dopamine neurotransmission may underlie the effects of GHB on motor activity (Nicholson and Balster, 2001).

Rodríguez-Arias et al. (2000) reported that 50 mg/kg of morphine induced a clear hyperactivity in mice. It has to be pointed out that, with the exception of the lower dose (25 mg/kg), all the GHB doses used (even those that do not decrease motor activity per se), were capable of counteracting morphine-induced hyperlocomotion, suggesting a specific role of GHB receptors in this action. This blockade was observed mainly during the first hour after drug administration. The mesolimbic DAergic neurons are necessary for the expression of hyperactivity induced by opioids (Iwamoto, 1981). The GHB action on the DAergic system suggests a stronger blockade of this morphine-induced hyperactivity. Additionally, GHB induced the release of endogenous opioids (Lason et al., 1983; Gobaille et al., 1994; Schmidt-Mutter et al., 1999) that could potentiate morphine-induced hyperactivity, but the present results suggest that its impairing actions on the DAergic system are more critical in this behavioural expression.

In social encounters, administration of 200 mg/kg of GHB produced a significant decrease in threat and attack without impairing motor activity. These results are in accord with others (Navarro and Pedraza, 1996) although with a lower range of doses (100 and 120 mg/kg). Even though the same strain of mice was used in both studies, the higher aggressiveness observed in the present animals may explain the necessity of using higher doses to achieve the antiaggressive action. The decrease in aggression observed after GHB administration supports the well-known antiaggressive action of DAergic antagonists in rodents especially in mice (Miñarro et al., 1990; Aguilar et al., 1994; Rodríguez-Arias et al., 1998, 1999). As previously mentioned, GHB can modulate DAergic neurotransmission either acting on the GHB or the GABA receptors. The fact that low doses, with a more specific blockade of GHB receptors, do not affect aggressive or social behaviours of mice suggests that the

GHB receptors are not principally responsible for the anti-aggressive actions of this compound. At higher doses, GABA_b receptor occupation and activation play a more important role (Nicholson and Balster, 2001). It is well known that activation of the GABA system reduces aggression in animals (Krsiak et al., 1981; Poshivalov, 1981; Puglisi-Allegra et al., 1981) as well in humans (Bjork et al., 2001; Cherek et al., 2002).

GHB at a dose of 200 mg/kg also increases the time spent in social contact (social investigation). An anxiolytic action for GHB has been observed in rats using other paradigms such as the elevated plus-maze (Schmidt-Mutter et al., 1998), being attributed to an action on the GABA_a benzodiazepine receptor complex (Schmidt-Mutter et al., 1998). Although the antiaggressive effects of GHB is similar to the behavioural profile of D₂ dopamine antagonists, this social effect is only observed after the administration of DA D₃ compounds (Rodríguez-Arias et al., 1999).

Although all the nonsedative doses of GHB used affected motor activity measured with the actimeter, no immobility or decrements in nonsocial exploration behaviour (with an essential motor component) were observed during the social encounters. These discrepancies between the results observed with these two different kinds of motor activity measured have been previously found with different DAergic antagonists (Rodríguez-Arias et al., 1998, 1999).

The morphine dose used (10 mg/kg) for the aggression tests clearly decreased attack without affecting other behaviours (except for an abolishment of digging). When administered with GHB, these two behavioural actions were maintained but new effects were observed. Although the time spent by the animals in nonsocial exploration was slightly increased after morphine administration, its coadministration with the two lower GHB doses (25 and 100 mg/kg) produced an additive effect, as a significant increase in this behaviour was observed. Another additive effect was also found in relation to indices of threat: All were decreased (nonsignificantly) by morphine administration alone. Coadministration with any GHB dose (which alone did not affect these behaviours), abolished threat completely. GHB may consequently potentiate the actions of morphine. On the other hand, the increase in social contact observed after administration of 200 mg/kg of GHB was counteracted by morphine.

GHB and opiates have a clear relationship, as many effects of GHB in animals can be mimicked by opioid receptor agonists (Bernasconi et al., 1999) and blocked by opioid receptor antagonists (Snead and Bearden, 1980; Maitre, 1997). In addition, GHB releases endogenous opioids such as proenkephalin (Schmidt-Mutter et al., 1999). Since GHB does not bind to opioid receptors and nor does naloxone bind to GHB receptors (Maitre, 1997; Feigenbaum and Simantov, 1996), these relationships could depend on GHB actions on dopamine or other neurotrans-

mitter systems, such as the GABAergic (Feigenbaum and Howards, 1997). Several studies indicate the existence of an interaction between GABAergic and opiate functions. GABA exert its action on different morphine-induced pharmacological effects, such as endocrine secretions (Maiewski et al., 1985), catalepsy, analgesia (Rattan and Sribanditmongkol, 1994) or anxiolytic behaviour in rats (Sasaki et al., 2002). Particularly interesting is the important role that GABA plays in opiate dependence. GABA administration has been shown to affect the development of tolerance (Ho et al., 1976) and physical dependence on morphine (Zarrindast and Mousa-Ahmadi, 1999; Bexis et al., 2001).

A similar action of GHB and DAergic antagonists has been proposed, specifically with the D₂ antagonists, which do not suppress motor activity (Navarro et al., 1996). The present results confirm that GHB has a similar behavioural profile to raclopride or sulpiride during the social encounters (Aguilar et al., 1994; Redolat et al., 1991). This was not so when the coadministration with morphine was studied. Administered jointly with haloperidol, morphine increases the impairing effect of haloperidol on motor activity but counteracts its antiaggressive actions (Rodríguez-Arias et al., 1997). Thus, although GHB has a similar behavioural profile to DA antagonists, its interaction with the opiate system seems quite different.

In conclusion, the present results confirm and extend the interaction between GHB and opioid systems. A number of papers have pointed out a dissociation between antiaggressive and motor effects of opiates, these behaviours affecting DAergic antagonists in a different way (Winslow and Miczek, 1988; Tidey and Miczek, 1992; Rodríguez-Arias et al., 1997). This dissociation was also observed in the present study when morphine was administered jointly with GHB. This compound had an additive effect in morphine-affected social behaviours but conversely was capable of efficiently counteracting the morphine-induced increase in motor activity. Taking these results and those obtained with DAergic antagonists together, the existence of two different ways controlling social and motor behaviours is suggested.

Acknowledgements

This research was supported by the following grants: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Dirección General de Investigación and FEDER (Ref BSO2002-00106); Instituto de Salud “Carlos III” (FIS), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (G03/005); and Dirección General de Drogodependencias (Proyecto de Investigación en materia de drogodependencias y otras adicciones, 2002), Conselleria de Bienestar Social, Generalitat Valenciana, Spain. We wish to thank Ms. Miriam Phillips for the English revision of the manuscript.

References

- Aguilar MA, Miñarro J, Pérez-Iranzo N, Simón VM. Behavioral profile of raclopride in agonistic encounters between male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;47:753–6.
- Banvides J, Rumugny JF, Bourguignon JJ, Cash C, Wernuth CG, Mandel P, et al. High affinity binding site for γ -hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci* 1982;30:953–61.
- Bernasconi R, Mathivet P, Bischoff S, Marescaux C. Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous modulator with potential abuse? *TIPS* 1999; 20:135–41.
- Bexis S, Ong J, White J. Attenuation of morphine withdrawal signs by the GABA(B) receptor agonist baclofen. *Life Sci* 2001;70:395–401.
- Bjork JM, Moeller FG, Kramer GL, Kram M, Suris A, Rush AJ, et al. Plasma GABA levels correlate with aggressiveness in relatives of patients with unipolar depressive disorder. *Psych Res* 2001;1001:131–6.
- Brain PF, McAllister KH, Walmsley SV. Drug effects on social behaviors. In: Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ, editors. *Methods in ethopharmacology. Psychopharmacology (series: Neuromethods, vol. 13)*. Clifton (NJ): The Humana Press; 1989. p. 687–739.
- Broughton R, Mamelak M. The treatment of narcolepsy–catalepsy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci* 1979;6:1–6.
- Cherek DR, Lane SD, Pietrans CJ, Sharon J, Steinberg JL. Acute effects of baclofen, a γ -aminobutyric acid-B agonist, on laboratory measures of aggressive and escape responses of adult male parolees with and without a history of conduct disorder. *Psychopharmacology* 2002;164:160–7.
- Cook CD, Aceto MD, Coop A, Beardsley PM. Effects of the putative antagonist NCS382 on the behavioral pharmacological actions of gamma-hydroxybutyrate in mice. *Psychopharmacology* 2002;160:99–106.
- Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5274–8.
- Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Fratta W. Gamma-hydroxybutyric acid. An evaluation of its rewarding properties in rats and mice. *Alcohol* 2000;20:247–56.
- Feigenbaum JJ, Howards G. Naloxone reverses the inhibitory effect of gamma-hydroxybutyrate on central DA release in vivo in awake animals: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 1997;224:71–4.
- Feigenbaum JJ, Simantov R. Lack of effect of gamma-hydroxybutyrate on mu, delta and kappa opioid receptor binding. *Neurosci Lett* 1996;212: 5–8.
- Gallimberti L, Gantile N, Cibir M, Fadda F, Canton G, Ferri M, et al. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Lancet*. 1989;787–9.
- Gallimberti L, Ferri M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL. Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double-blind study. *Alcohol Clin Exp Res* 1992;16:673–6.
- Gallimberti L, Cibir M, Pagnin P, Sabbion R, Pani PP, Pirastu R, et al. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology* 1993;9:77–81.
- Gallimberti L, Schifano F, Forza G, Miconi L, Ferrara SD. Clinical efficacy of gamma-hydroxybutyric acid in treatment of opiate withdrawal. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1994;244:113–4.
- Gessa GL, Vatgui L, Crabai F, Boero GC, Caboni F, Camba R. Selective increase of brain dopamine induced by γ -hydroxybutyrate. *Life Sci* 1966;5:1921–30.
- Gobaille S, Schmidt C, Cupo A, Herbrecht F, Maitre M. Characterization of methionine-enkephalin release in the rat striatum by in vivo dialysis: effects of gamma-hydroxybutyrate on cellular and extracellular methionine-enkephalin levels. *Neuroscience* 1994;60:637–48.
- Ho LK, Loh HH, Way EL. Pharmacological manipulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) in morphine analgesia, tolerance and physical dependence. *Life Sci* 1976;18:1111–24.
- Itzhak Y, Ali SF. Repeated administration of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) to mice: assessment of the sedative and rewarding effects of GHB. *Ann N Y Acad Sci* 2002;965:451–60.
- Iwamoto ET. Locomotor activity and antinociception after putative and

- opioid receptor agonists in the rat: influence of dopaminergic agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;217:451–60.
- Krsiak M, Sulcova A, Tomasikova Z, Dlohozkova N, Kosar E, Masek K. Drug effect on attack, defence and escape in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;14:47–52.
- Kudryavtseva N, Lipina TV, Koryakina L. Effects of Haloperidol on communicative and aggressive behavior in male mice with different experiences of aggression. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;63:229–36.
- Laborit G, Larcan A, Kind A. Le gamma-hydroxybutyrate en anesthesie-neuro-cirurgicale. *Neurochirurgie* 1962;8:104–7.
- Lason W, Przewlocka B, Przewlocki R. The effect of gamma-hydroxybutyrate and anticonvulsants on opioid content in the rat brain. *Life Sci* 1983;33:599–602.
- Maiewski SF, Larscheid P, Cook JM, Mueller GP. Evidence that a benzodiazepine receptor mechanism regulates the secretion of pituitary beta-endorphin in rats. *Endocrinology* 1985;117:474–80.
- Maitre M. The γ -hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* 1997;51:337–61.
- Manier M, Abrons DN, Feuerstein C, Le Moal M, Herman JP. Increase in methionin-enkephalin content following lesion of nigrostriatal dopaminergic pathway in adult rats and reversal following the implantation of embryonic dopaminergic neurons: a quantitative immuno-histochemical analysis. *Neuroscience* 1991;42:427–39.
- Miczek KA, Fish EW, Bold JF, Almeida RMM. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ -aminobutyric acid system. *Psychopharmacology* 2002;163:434–58.
- Miñarro J, Castaño D, Brain PF, Simón VM. Haloperidol does not antagonize the effects of stress on aggressive behaviour in mice. *Physiol Behav* 1990;47:281–7.
- Morgenroth VH, Walters JR, Roth RH. Dopaminergic neurons: alteration in the kinetic properties of tyrosine hydroxylase after cessation of impulse flow. *Biochem Pharmacol* 1976;25:655–61.
- Navarro JF, Pedraza MC. An ethopharmacological assessment of the effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) on agonistic interactions in male mice. *Med Sci Res* 1996;24:817–9.
- Navarro JF, Martín-López M, Manzanque JM, Pedraza C, Dávila G. Dose-dependent effect of gamma-hydroxybutyrate (GHB) on catalepsy in male mice. *Med Sci Res* 1996;24:603–4.
- Nicholson KL, Balster RL. GHB: a new novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend* 2001;63:1–22.
- Nissbrandt H, Elverfors A, Engberg G. Pharmacologically induced cessation of burst activity in nigral dopamine neurons: significance for the terminal dopamine efflux. *Synapse* 1994;17:217–24.
- Poshivalov VP. Pharmacological analysis of social behavior in isolated mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;14:53–9.
- Puglisi-Allegra S, Simler S, Kempf E, Mandel P. Involvement of the GABAergic system on shock-induced aggressive behavior in two strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;14:13–8.
- Rattan AK, Sribanditmongkol P. Effect of morphine-induced catalepsy, lethality, and analgesia by a benzodiazepine receptor agonist midazolam in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48:357–61.
- Redolat R, Brain PF, Simon VM. Sulpiride has an antiaggressive effect in mice without markedly depressing motor activity. *Neuropharmacology* 1991;30:41–6.
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Simón VM. Interaction of morphine and haloperidol on agonistic behavior in male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:153–8.
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Simón VM. Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 1998;8:95–103.
- Rodríguez-Arias M, Felip CM, Broseta I, Miñarro J. The dopamine D3 antagonist U-99194^a maleate increases social behaviors in isolation-induced aggressive male mice. *Psychopharmacology* 1999;144:90–4.
- Rodríguez-Arias M, Broseta I, Aguilar MA, Miñarro J. Lack of specific effects of selective d1 and d2 dopamine antagonists vs risperidone on morphine-induced hyperactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:189–97.
- Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J. Memantine blocks motor but not antiaggressive effects of morphine. *Behav Pharmacol* 2002;13:249–52.
- Roth RH, Doherty JD, Walters JR. Gamma-hydroxybutyrate: a role in the regulation of central dopaminergic neurons? *Brain Res* 1980;189:556–60.
- Sasaki K, Fan LW, Tien LT, Ma T, Loh HH, Ho IK. The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Bull* 2002;57:689–94.
- Schmidt-Mutter C, Pain L, Sandner G, Gobaille S, Maitre M. The anxiolytic effect of γ -hydroxybutyrate in the elevated plus-maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil. *Eur J Pharmacol* 1998;342:21–7.
- Schmidt-Mutter C, Gobaille S, Muller C, Maitre M. Prodynorphin and proenkephalin mRNA are increased in rat brain after acute and chronic administration of gamma-hydroxybutyrate. *Neurosci Lett* 1999;262:65–8.
- Smoothy R, Brain PF, Berry MS, Haug M. Alcohol and social behaviour in group-housed female mice. *Physiol Behav* 1986;37:689–94.
- Snead OC, Bearden LJ. Naloxone overcomes the dopaminergic EEG and behavioural effects of γ -hydroxybutyrate. *Neurology* 1980;30:832–8.
- Snead OC, Bearden LJ. The epileptogenic spectrum of opiate agonists. *Neuropharmacology* 1982;21:1137–44.
- Spano PF, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. Stimulation of brain dopamine synthesis by gamma-hydroxybutyrate. *J Neurochem* 1971;18:1831–6.
- Stell JM, Ryan JM. Gamma-hydroxybutyrate is a new recreational drug that may lead to loss of consciousness. *BMJ* 1996;313:424.
- Tang F, Costa E, Schwartz JP. Increase of proenkephalin mRNA and enkephalin content of rat striatum after injection of haloperidol for 2 or 3 weeks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:3841–4.
- Tidey JW, Miczek KA. Morphine withdrawal aggression: modifications with D1 and D2 receptor agonists. *Psychopharmacology* 1992;108:177–84.
- Vayer P, Maitre M. γ -Hydroxybutyrate stimulation of the formation of cyclic GMP and inositol phosphates in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1989;52:1382–7.
- Vayer P, Mandel P, Maitre M. Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* 1987;41:1547–57.
- Winslow JT, Miczek KA. Naltrexone blocks amphetamine-induced hyperactivity but not disruption of social and agonistic behavior in mice and squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 1988;96:493–9.
- Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 1987;94:469–92.
- Zarrindast MR, Mousa-Ahmadi E. Effects of GABAergic system on naloxone-induced jumping in morphine-dependent mice. *Eur J Pharmacol* 1999;381:129–33.
- Zerbib R, Pierrefiche G, Ferran C, Laborit H. Potential antidepressant activity of gamma-hydroxybutyrate in the mouse “behavioral despair” test: correlation with the central dopaminergic system. *Res Commun Psychol Psych Behav* 1992;17:109–22.



Estudio 5



Estudio 5: El GHB mejora el condicionamiento aversivo de lugar y los síntomas físicos del síndrome de abstinencia a la morfina inducido por naloxona en ratones.

Investigación original: Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, María A. Aguilar, José Miñarro (2004). GHB ameliorates naloxone-induced conditioned place aversion and physical aspects of morphine withdrawal in mice. *Psychopharmacology*, 177: 130-140.

El ácido Gamma hidroxibutírico (GHB) es un metabolito del ácido gamma aminobutírico (GABA), el cual es una sustancia que se encuentra de forma natural en el cerebro. Se ha sugerido que el GHB podría actuar como neuromodulador o neurotransmisor, presentando lugares de unión de alta y baja afinidad, que corresponderían respectivamente a los receptores GHB y GABA_B.

Aunque originalmente el GHB se utilizó como anestésico y en el tratamiento de la narcolepsia, estudios clínicos más recientes le confieren la capacidad de comportarse como una droga de abuso. Cuando se administra por vía oral y a dosis no sedativas ha demostrado ser eficaz reduciendo el deseo y el malestar durante la abstinencia al alcohol y a los opiáceos.

Numerosas investigaciones sugieren que el GHB puede interferir con los sistemas cerebrales responsables de la expresión de las propiedades reforzantes de las sustancias de abuso y en los cambios neuroadaptivos que ocurren en el proceso de la dependencia. Tanto el síndrome de abstinencia al alcohol como a los opiáceos se asocia con la inhibición de la actividad dopaminérgica en el estriado y en el área mesocorticolímbica. Esta actividad reducida puede ser la causa del estado depresivo, que se observa en numerosos casos de abstinencia. No existe

un acuerdo unánime respecto a la acción que el GHB ejerce sobre la neurotransmisión dopaminérgica, aunque parece que tras una inicial disminución se produce un incremento en la liberación de DA. Además, el GHB afecta al sistema endógeno, efecto que podría producir la desaparición del deseo y malestar asociado a la abstinencia de la droga.

Aunque en seres humanos se ha demostrado que el GHB mejora los síntomas físicos de la abstinencia a los opiáceos, no se han estudiado sus efectos sobre los aspectos motivacionales de dicha abstinencia. Los tratamientos farmacológicos ofrecen escasos resultados en el abuso a opiáceos, fundamentalmente porque fármacos como la clonidina mejoran esencialmente los aspectos físicos del síndrome de abstinencia. Por lo tanto, las manipulaciones farmacológicas que disminuyan los aspectos motivacionales de la abstinencia a los opiáceos se pueden considerar como tratamientos más beneficiosos (a largo plazo) de la dependencia a estas sustancias de abuso.

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que utilice modelos animales con el fin de evaluar las acciones positivas del GHB en la abstinencia a la morfina y confirmar los resultados encontrados en seres humanos. En los estudios realizados con heroinómanos es muy difícil controlar la cantidad total o la pureza de la droga consumida, además de que es frecuente el uso conjunto de otras drogas. Las alteraciones pre existentes en diversos sistemas de neurotransmisión, como el dopaminérgico o el opoide, no se pueden eliminar en estos estudios clínicos. El modelo animal utilizado con más frecuencia para evaluar los aspectos motivacionales de la abstinencia a la morfina es el paradigma de condicionamiento aversivo de lugar (CAL) inducido por naloxona, considerándose un índice fiable y sensible del estado motivacional aversivo que acompaña la abstinencia aguda de la dependencia a los opiáceos. Este modelo emplea un condicionamiento Pavloviano clásico ya que los animales

evitan los estímulos ambientales asociados previamente con reforzadores negativos tales como naloxona (aversión de lugar). Con el propósito de clarificar mejor la acción del GHB sobre la abstinencia a la morfina inducida por naloxona, en animales dependientes a la morfina hemos estudiado ambos aspectos del síndrome de abstinencia. En el primer experimento, estudiamos la capacidad del GHB para bloquear el condicionamiento aversivo de lugar (CAL) inducido por naloxona, administrado tanto durante la fase de adquisición como en la de expresión. En el segundo experimento, observamos el efecto del GHB sobre el síndrome físico de la abstinencia a la morfina.

En el primer experimento (CAL), con el fin de inducir la dependencia a la morfina se administró a todos los grupos un tratamiento con dosis crecientes de este opiáceo (6, 12, 25, 50 y 100 mg/kg) cada 24 horas. La dosis más alta (100 mg/kg) se alcanzó el quinto día y fue mantenida durante todo el condicionamiento (8 días). Seis grupos recibieron una inyección de suero fisiológico cada 24 horas. En los grupos correspondientes, el GHB se administró en un rango de dosis desde 6 a 50 mg/kg. Se utilizó una dosis de 0.25 mg/kg de naloxona, a excepción del estudio de la curva dosis respuesta donde se utilizó un amplio rango de dosis (desde 0.031 a 1mg/kg).

Para realizar el condicionamiento se utilizaron cuatro cajas idénticas de "Plexiglas", con dos compartimentos de igual tamaño, que diferían en el color de sus paredes (blanco/negro) y en la textura del suelo (liso/rugoso), separados por un área central. El procedimiento, no sesgado ("unbiased") contra-balanceado en términos de la preferencia inicial. El procedimiento de administración de los fármacos, constaba de tres fases. En la primera fase, llamada de pre-condicionamiento, los animales tenían libre acceso a los compartimentos durante 20 minutos (1200 segundos), registrándose el tiempo pasado en cada uno ellos. Los animales que mostraron una fuerte

aversión (menos de 260 s) o preferencia (más de 780 s, excepto en la curva dosis respuesta de la naloxona, que fue 900 s) por alguno de los compartimentos fueron descartados del experimento. Un compartimento fue elegido para ser asociado con la naloxona y el otro con el suero fisiológico, de tal manera que dentro de cada grupo la mitad de los animales recibieron el tratamiento en el lugar menos preferido y la otra mitad en el preferido (contrabalanceo por preferencia). Después de la asignación de compartimentos, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que permanecían en el lugar pareado con la naloxona o con el vehículo en la fase de pre-condicionamiento.

En la segunda fase (condicionamiento), cuya duración fue de seis días, los animales recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante veinte minutos en el compartimento elegido para ser asociado con el vehículo y a las veinticuatro horas recibían la naloxona justo antes de ser confinados durante el mismo periodo de tiempo en el compartimento elegido para ser asociado con el fármaco (los grupos apropiados, recibían GHB en lugar de la naloxona treinta minutos antes del confinamiento). En cinco grupos de animales no dependientes a la morfina, se inyectó naloxona (grupo Sal-Nal) o GHB (grupos Sal-GHB 6, Sal-GHB 12.5, Sal-GHB 25 y Sal-GHB 50mg/kg) para verificar la acción de estos compuestos por sí mismos. En siete grupos de animales dependientes a la morfina, los animales fueron inyectados con naloxona (grupo M-Nal) o diferentes dosis de GHB (grupos M-GHB 6, M-GHB 12.5, M-GHB 19, M-GHB 25, M-GHB 37.5 y M-GHB 50 mg/kg), para verificar si estas drogas eran capaces de producir aversión por sí mismas.

En cuatro grupos más, para evaluar los efectos sobre la adquisición del CAL inducido por la naloxona, los animales fueron inyectados con GHB treinta minutos antes de recibir la naloxona (grupos de adquisición), para verificar si éstos fármacos eran capaces de bloquear la aversión inducida

por la naloxona durante la fase de condicionamiento (grupos GHB 6 acq, GHB 12.5 acq, GHB 25 acq y GHB 50 acq).

Durante la tercera fase, llamada post-condicionamiento (test), se registraba el tiempo que el animal, libre de cualquier tratamiento, pasaba en cada compartimento durante 20 minutos. En esta última fase, todos los animales recibieron una sola inyección de morfina o salino en su propia jaula. Adicionalmente a los grupos anteriormente mencionados, en otros seis grupos los animales recibieron GHB 30 minutos antes de realizar la prueba (grupos de expresión), para determinar si éste fármaco era capaz de bloquear la aversión condicionada inducida por la naloxona (grupos GHB 6 exp, GHB 12.5 exp, GHB 19 exp, GHB 25 exp, GHB 37.5 exp y GHB 50 exp). Además, con el propósito de verificar cómo el hecho de no administrar la morfina afectaría la expresión del condicionamiento, un grupo de ratones dependientes condicionados con naloxona no recibieron morfina el día del test (grupo M-Nal-Spt).

Con el propósito de explorar más ampliamente los efectos de 25 mg/kg de GHB, se realizó un experimento utilizando un número más elevado de condicionamientos con naloxona (4 y 5) y administrando esta dosis durante la fase de expresión del condicionamiento. El procedimiento fue similar al descrito anteriormente, siendo la duración de este experimento más larga (10 y 12 días, respectivamente).

La diferencia, en segundos, entre el tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la naloxona entre el día de pre-condicionamiento y del post-condicionamiento es una medida del grado de aversión inducido por la naloxona. Si no existen diferencias, significa que el tratamiento ha bloqueado el condicionamiento aversivo de lugar inducido

por la naloxona, mientras que lo opuesto indicaría que el tratamiento no ha sido capaz de bloquear esta aversión.

La curva dosis respuesta de la naloxona, nos mostró que dosis iguales o superiores a 0.125 mg/kg de este antagonista opiáceo son capaces de inducir aversión al lugar asociado con su administración.

La administración de 0.250 mg/kg de naloxona o 25 mg/kg de GHB en animales dependientes de la morfina, indujo el desarrollo de aversión al lugar asociado con su administración. Cuando el GHB se administró en la fase de adquisición del condicionamiento, solo los animales condicionados con la dosis más baja permanecieron menos tiempo en el compartimento asociado a la droga en el post-condicionamiento en comparación con la fase de pre-condicionamiento. Cuando el GHB se administró en la fase de expresión del condicionamiento, ninguno de los grupos desarrolló CAL. En el estudio en el que se realizaron cuatro o cinco condicionamientos los animales mostraron una fuerte aversión por el compartimento asociado a la droga, aunque no se observó esta aversión tras la administración de 25 mg/kg de GHB en la prueba de post-condicionamiento

En el segundo experimento, estudiamos el efecto del GHB en la expresión del síndrome físico inducido por la naloxona en ratones dependientes de la morfina. El programa de inducción de dependencia a la morfina duró 11 días, inyectándose dosis crecientes de morfina (6, 12, 25, y 100 mg/kg) durante los cinco primeros días hasta llegar a la dosis máxima (100mg/kg) manteniendo esta dosis durante 6 días más. Los grupos control recibieron una inyección de suero fisiológico una vez al día durante el mismo periodo de tiempo. Por lo tanto, en este segundo experimento, los animales presentaron el mismo grado de dependencia a la morfina que en el primero. Para confirmar la abstinencia a la morfina, se administró 1 mg/kg de naloxona o suero fisiológico el día de la prueba. Con el propósito de

evaluar el efecto del GHB en animales dependientes, en tres grupos adicionales, tras la inducción de la dependencia a la morfina se les inyectó diferentes dosis de GHB treinta minutos antes de la realización de la prueba. Adicionalmente, a tres grupos más se les administró las mismas dosis de GHB pero treinta minutos antes de inyectarles la naloxona, mostrando estos grupos el efecto del GHB sobre la intensidad del síndrome de abstinencia físico. También quisimos evaluar la acción del GHB sobre la abstinencia espontánea, para lo cual en cuatro grupos, tras recibir el mismo programa de inducción, se interrumpió la administración de morfina y 48 horas después se realizó la evaluación conductual. La duración del efecto del GHB en esta clase de abstinencia, se estudió evaluando los signos físicos de la abstinencia a los 30 minutos, a las 3, 6, 12 y 24 horas tras la administración del GHB. Finalmente, el efecto de la administración crónica de GHB en la aparición de signos físicos de la abstinencia a la morfina, se estudió en una serie de grupos adicionales que recibieron 11 inyecciones diarias de diferentes dosis de GHB (6, 12 y 25 mg/kg).

El test conductual fue grabado con una cámara de vídeo con el fin de proceder a su ulterior análisis mediante un programa de ordenador (Ratón time) que permite la valoración del tiempo dedicado por los animales a cada categoría de conducta. Todas las valoraciones se realizaron mediante la técnica de "simple ciego". Las conductas evaluadas fueron las siguientes: frecuencia de temblor de patas, de temblor de cuerpo y de saltos; ausencia o presencia de ptosis y diarrea; y por último, el tiempo dedicado a la conducta de aseo genital. Además de estas conductas, se calculó el porcentaje de pérdida de peso de los animales. También, se realizó una valoración única para cada grupo, usando una modificación de la escala descrita por Gellert y Holtzman en la que se distinguen dos clases de signos. Los signos considerados como cuantificables fueron: pérdida de peso (cada 1% de pérdida de peso se cuantificó como 1); número de saltos (1-4 cuantificado como 1, 5-9 cuantificado como 2, y >10 cuantificado como

3); número de temblores de cuerpo (1-2 cuantificado como 2, >3 cuantificado como 4). Los signos observables, en los que sólo se evaluó su presencia o ausencia, fueron los siguientes: diarrea (2), ptosis (2), postura anormal (3) y erección o eyaculación (aseo genital) (2).

Los temblores de patas y el temblor del cuerpo fueron observados en todos los grupos dependientes a la morfina que recibieron naloxona, aunque existió un aumento significativo de esta conducta en los animales dependientes que recibieron sólo naloxona con respecto al resto de los grupos. En los grupos en abstinencia espontánea, las dosis mayores de GHB (12.5 y 25 mg/kg) disminuyen los signos del síndrome físico, pero sólo cuando la prueba se realizó 30 minutos (también a las 3 horas para el temblor del cuerpo) después de la administración de GHB. Así mismo, estos signos prácticamente desaparecen en el grupo control de abstinencia espontánea 12 horas después de la primera evaluación. La categoría de saltos sólo fue observada en los animales dependientes que recibieron naloxona. Por último, en la escala de Gellert-Holtzman el grupo dependiente de morfina que recibió naloxona y los grupos dependientes que recibieron junto a la naloxona las dosis menores de GHB (6 y 12.5 mg/kg) presentaron un aumento significativo en la puntuación de esta escala con respecto al grupo control. La administración crónica de GHB no produjo signos apreciables de abstinencia en ninguna de las conductas evaluadas.

Numerosos estudios realizados con adictos al alcohol o a los opiáceos indican que la administración de GHB puede mejorar los síntomas de la abstinencia a dichas sustancias. El presente estudio confirma e incluso amplía, en ratones dependientes a la morfina, las observaciones obtenidas con seres humanos, demostrando que el GHB es capaz de mejorar tanto los aspectos físicos como motivacionales de la abstinencia a los opiáceos. El GHB, administrado durante la fase de adquisición o expresión del CAL inducido por la naloxona en animales dependientes, el GHB contrarresta

esta aversión de forma consistente. Por otro lado, también reduce la intensidad de los signos físicos del síndrome de abstinencia a la morfina evaluado a través de la escala modificada de Gellert-Holtzman. Sus efectos sobre conductas específicas, tales como saltos, temblor de patas o cuerpo, también confirman sus acciones beneficiosas. Sin embargo, la evaluación de sus efectos sobre la abstinencia espontánea a la morfina muestra que su acción es de corta duración, no más de tres horas, lo que reduce su potencial terapéutico como herramienta de tratamiento en adictos a opiáceos.

Con el modelo de preferencia condicionada utilizado en nuestro laboratorio, la administración de GHB en los animales tratados con suero fisiológico no induce efectos motivacionales aparentes. Al administrar GHB a animales dependientes de la morfina, aunque las dosis altas y bajas no demostraron efectos, la intermedia (25 mg/kg) indujo una clara aversión de lugar. No se han realizado estudios anteriores que determinen el efecto de la administración de GHB en animales dependientes pero no abstinentes. El estado neurobiológico de un animal dependiente a la morfina es muy diferente del que no lo es, por lo que la administración de GHB puede inducir diferentes efectos motivacionales. El hecho de que solamente esta dosis intermedia induzca aversión podría deberse a diferentes causas, tales como el porcentaje de alta o baja afinidad de la ocupación del receptor o de su influencia sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Los antagonistas DA o los inhibidores de la liberación de DA bloquean la preferencia de lugar inducida por la morfina y por este mismo mecanismo el GHB podría inducir aversión en ratones dependientes de la morfina. Sin embargo, cuando se induce el CAL utilizando un número mayor de ensayos, la dosis de 25 mg/kg de GHB sí es capaz de bloquear esta aversión. Estos resultados demuestran que con esta dosis, el GHB exhibe sus efectos dependiendo de las características del procedimiento empleado en el condicionamiento.

En este estudio hemos confirmado que 0,250 mg/kg de naloxona, induce CAL en ratones dependientes de la morfina. Durante la fase de adquisición, cuando el GHB es administrado junto con el antagonista opiáceo, dosis iguales o superiores a 12,5 mg/kg bloquean totalmente el desarrollo de la aversión de lugar inducida por la naloxona. Administrado durante la fase de expresión, en una situación en la cual la aversión se ha adquirido normalmente, el GHB parece ser aún más potente puesto que, hasta con 6 mg/Kg se bloquea el CAL. Estos resultados confirman que el GHB puede inhibir el componente motivacional de la abstinencia a la morfina.

El estudio de los signos físicos de la abstinencia a morfina ha demostrado que el GHB es también eficaz disminuyendo la intensidad hasta niveles cercanos a los del grupo control. La escala de Gellert-Holtzman demuestra que la dosis de 25 mg/kg mejora la intensidad de la abstinencia física, efecto igualmente evidente cuando se observan las conductas por separado. Como hemos visto anteriormente la dosis 25 mg/kg de GHB no afecta la expresión del CAL, sin embargo sí alivia los signos de la abstinencia física a la morfina. La base neurobiológica de los aspectos físicos y motivaciones de la abstinencia a la morfina es diferente, encontrándose implicadas diferentes estructuras cerebrales en cada uno de ellos. El CAL se puede inducir con dosis de naloxona que no producen signos físicos apreciables, no estando correlacionados el inicio y magnitud de la abstinencia física con el condicionamiento aversivo, por lo que estos resultados no deben sorprendernos.

Al estudiar la abstinencia espontánea hemos observado que, aunque la intensidad de los signos observados es menor, el GHB también disminuye la mayoría de los comportamientos estudiados, como el temblor de patas o de cuerpo. Sin embargo, este efecto es de corta duración, con un máximo de 3 horas para los temblores de cuerpo y solamente 30 minutos

para el temblor de la patas. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores sobre la corta duración del efecto del GHB en humanos, alrededor de 2-3 horas, al igual que en ratones. Por otra parte, la administración de GHB en ratones dependientes no induce ninguna muestra apreciable de abstinencia, coincidiendo estos resultados con los observados en estudios clínicos.

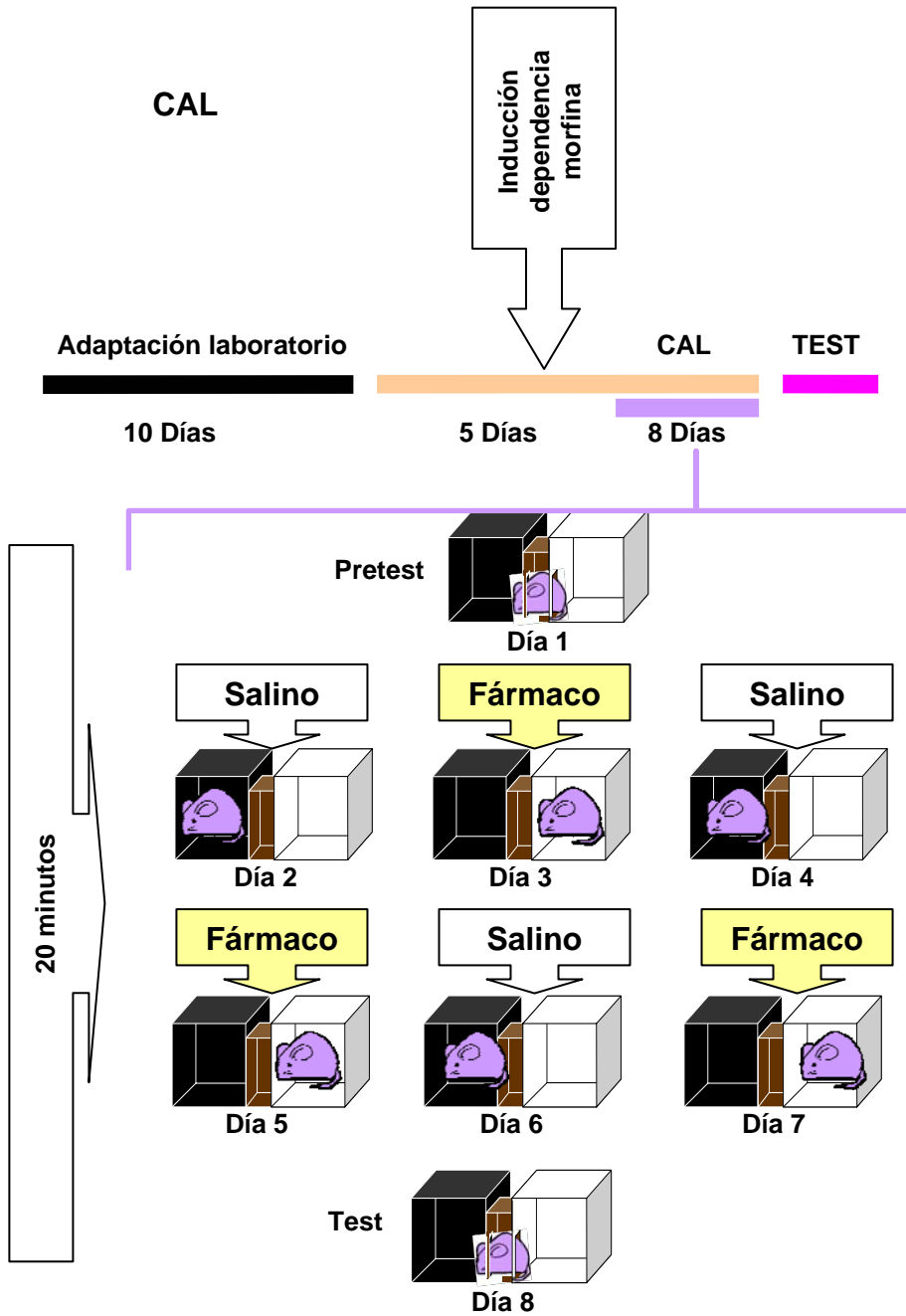
El uso de diversas dosis del naloxona (más bajas para los estudios de CPA) permite la disociación entre los signos somáticos y los efectos aversivos inducidos por la abstinencia a la morfina. Así, el CAL puede reflejar sólo el estado afectivo negativo y la disforia asociados con la abstinencia a la morfina. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la administración de GHB reduce tanto los aspectos motivacionales como los físicos de la abstinencia a la morfina. Sus múltiples efectos sobre los diversos sistemas de neurotransmisión dificultan el dar una simple explicación de su mecanismo de actuación. Debido al importante papel desempeñado por la DA en la abstinencia a la morfina, este sistema de neurotransmisión podría ser uno de los más directamente implicados. Dependiendo de la dosis usada, el GHB podría inducir la activación o la disminución de la neurotransmisión DA.

Además de estos efectos sobre el sistema dopaminérgico, el efecto potenciador del GHB sobre el sistema opiáceo endógeno podría también mejorar la abstinencia a la morfina. El GHB y la morfina inducen una gran variedad de efectos similares, el GHB provoca un acúmulo de metencefalina y de proencefalina en el estriado, probablemente mediados por la DA. Sin embargo, los receptores opiáceos parecen no estar implicados en las acciones del GHB, no pareciendo existir una verdadera dependencia cruzada entre el GHB y los opiáceos. Muchos otros neurotransmisores, como la serotonina o el GABA, se ven afectados después de la administración de GHB. Este se une al receptor GABA_B estando claramente

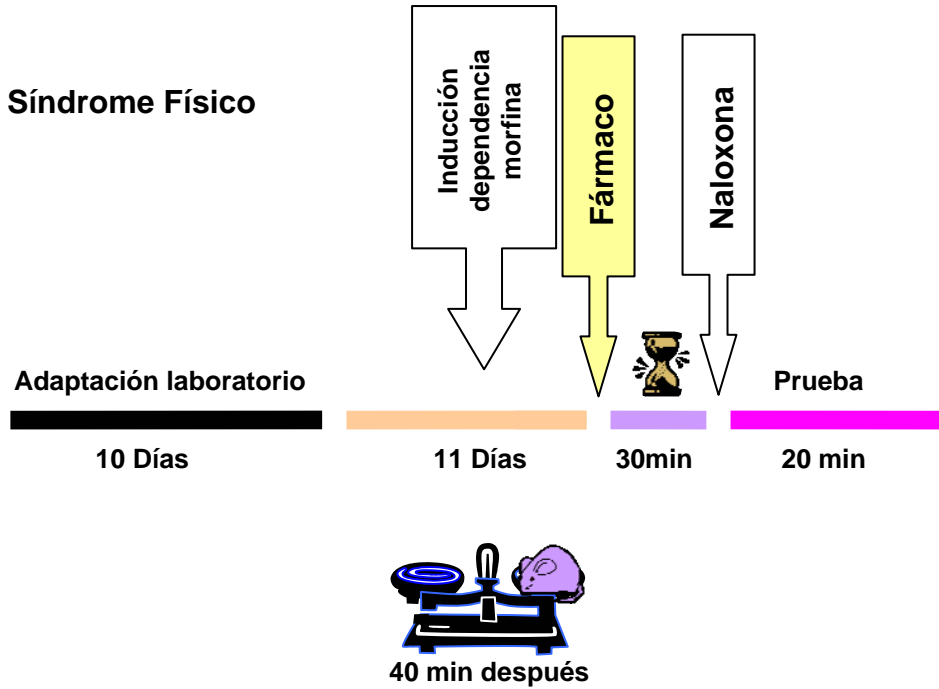
demostrado que los agonistas de este receptor atenúan los signos de la abstinencia a la morfina y restauran los bajos niveles cerebrales de DA observados en esta situación. Por lo tanto, también podríamos considerar que la mejoría en la abstinencia a la morfina inducida por el GHB podría producirse a través de una acción en el sistema GABAérgico.

En conclusión, nuestros resultados apoyan la idea de que el GHB es capaz de mejorar tanto los aspectos físicos como motivacionales de la abstinencia a la morfina. Esta sustancia podría ser útil para el tratamiento de los adictos a la heroína, aunque a la luz de los estudios que indican su potencial de abuso (desarrollo de tolerancia y dependencia), deben de tomarse en consideración las pertinentes precauciones. A pesar de de todo ello, el GHB podría considerarse como una herramienta útil para el tratamiento del abuso a los opiáceos, teniendo en cuenta que dosis muy bajas parecen ser suficientes para conseguir el efecto deseado.

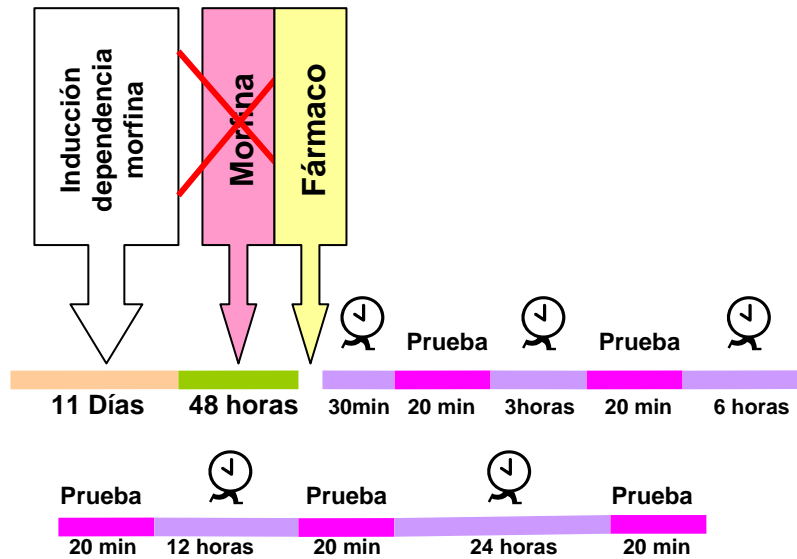
PROTOCOLO DE ADMINISTRACION



Síndrome Físico



Duración Efecto GHB en abstinencia Espontánea a morfina



Concepción Maldonado · Marta Rodríguez-Arias ·
María A Aguilar · José Miñarro

GHB ameliorates naloxone-induced conditioned place aversion and physical aspects of morphine withdrawal in mice

Received: 5 December 2003 / Accepted: 30 April 2004 / Published online: 4 June 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract *Rationale:* Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a naturally occurring substance in the brain, the administration of which has proved useful in the treatment of the opiate withdrawal symptoms in humans. *Objectives:* The aim of the present work was to validate this beneficial effect on the physical and motivational aspects of morphine withdrawal in mice. *Methods:* In a first experiment, animals rendered morphine-dependent were conditioned to develop a place aversion (CPA) to the compartment paired with naloxone administration in a two-chamber apparatus. The conditioning phase consisted of three pairings of either naloxone (0.250 mg/kg) or vehicle in one compartment, both with similar time allotments during the preconditioning test. During the testing phase, mice were again allowed to explore the entire apparatus. GHB (6, 12.5, 25, and 50 mg/kg) was administered during either the acquisition or expression phase of this conditioning. In a second experiment, the capacity of GHB to ameliorate the intensity of physical signs of morphine withdrawal was evaluated. *Results:* GHB blocked CPA in both phases: administered during acquisition (from 12.5 mg/kg and higher) as well as in the expression phase (from 6 mg/kg, except for 25 mg/kg). It also decreased the intensity of physical signs of morphine withdrawal to near control levels measured by the modified Gellert–Holtzman scale (25 mg/kg and higher). Decreases in jumping, body shakes, and paw tremor were also observed. *Conclusions:* Our results support the idea that GHB ameliorates both aspects of morphine withdrawal, physical as well as motivational signs.

Keywords GHB · Morphine · Conditioned place aversion · Withdrawal syndrome · Naloxone · Mice

Introduction

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a metabolite of gamma-aminobutyric acid (GABA), thus being a naturally occurring substance in the brain (Maitre 1997). It has been suggested that GHB plays a role as a neuromodulator or neurotransmitter (Vayer et al. 1987), presenting two classes of binding sites of high and low affinity, GHB and GABA_b receptors, respectively (Maitre 1997).

GHB was originally used for its anaesthetic actions (Laborit et al. 1962) or for the treatment of narcolepsy (Broughton and Mamelak 1979). More recently, a role for GHB in drug dependence was postulated on the basis of clinical studies. It can reduce craving (Gallimberti et al. 1992) and malaise during withdrawal from alcohol (Gallimberti et al. 1989, 2000) and from opiates (Gallimberti et al. 1993, 1994, 2000) when given orally in non-sedative doses (typically 25–50 mg/kg) to dependent individuals.

Numerous observations suggest that GHB may interfere with the brain systems responsible for the expression of the acute reinforcing properties of drugs of abuse and for the expression of the neuroadaptive changes in the dependence process (Fattore et al. 2000). Both ethanol and morphine withdrawal syndromes are associated with inhibition of dopaminergic activity in the striatum and in the mesocorticolimbic area. This reduced activity may be the basis for the dysphoric state, which is observed in many cases of drug withdrawal. There is no agreement with respect to the action of GHB on dopaminergic neurotransmission. Activation of the dopaminergic system by this compound has been documented in several reports (Cheremy et al. 1977; Broughton and Mamelak 1979; Diana et al. 1991; Hechler et al. 1991), but opposite results have also been found (Howard and Feigenbaum 1997). In addition to the effects on dopaminergic neurotransmission, the potentiating action of GHB on the endogenous

C. Maldonado · M. Rodríguez-Arias · M. A. Aguilar ·
J. Miñarro (✉)
Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología,
Universitat de Valencia,
Avda Blasco Ibáñez 21,
46010 Valencia, Spain
e-mail: jose.minarro@uv.es
Tel.: +34-96-3864020
Fax: +34-96-3864668

expression of some opiate activity could favor the disappearance of drug craving and withdrawal (Maitre 1997).

Although GHB seems to ameliorate the physical signs of opiate withdrawal in humans, to our knowledge, its effects on the motivational aspects of withdrawal have not been studied. The poor overall outcome of pharmacological treatments of opioid abuse could be caused by the fact that treatments, such as clonidine administration, principally improve physical aspects of the opioid withdrawal syndrome. Therefore, pharmacological manipulations that would diminish the motivational aspects of opioid withdrawal may be considered as more beneficial treatments of opioid dependence (Popik and Danysz 1997). No studies have been performed using animal models to evaluate the positive actions of GHB on morphine withdrawal to confirm the results found in humans. Performing studies on humans presents several difficulties, two of the most common being the control of the total amount or purity of the drug consumed, and the fact that polydrug use is frequent. In addition, pre-existing abnormalities in different neurotransmitter systems, such as the dopaminergic or opioid, cannot be ruled out in clinical studies. Therefore, pre-clinical data would be helpful in allowing clearer information about GHB actions on morphine withdrawal. To test the motivational aspects of morphine withdrawal, the widely used animal model is naloxone-induced conditioned place aversion (CPA) (Azar et al. 2003). This model employs a classical Pavlovian conditioning, since animals avoid environmental stimuli previously paired with negative events such as naloxone administration (place aversion). With the aim of further clarifying the role of GHB in naloxone-induced morphine withdrawal, both aspects of the withdrawal syndrome were studied in morphine-dependent mice. In the first experiment, the ability of GHB to block naloxone-induced CPA, administered either during the acquisition or expression phase, was studied. In a second experiment, the capacity of GHB to decrease the physical syndrome of morphine withdrawal was evaluated.

Materials and methods

Experiment 1: conditioned place aversion

Subjects

In this first study, 226 albino male mice of the OF1 strain, acquired in Charles River (Barcelona, Spain) were used. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of four, in transparent plastic cages (22×38 cm), for an adaptation time of 10 days, under the following conditions: constant temperature (21±2°C), a reversed light schedule (white lights on 1930–0730 hours), and food and water available ad libitum, except during the behavioral test. Procedures involving mice and their care conformed to national, regional and local laws and regulations, and are in accord with the European

Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

Apparatus

Four identical Plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm long×31.5 cm wide×34.5 cm high) separated by a gray central area (13.8 cm long×31.5 cm wide×34.5 cm high) were used. The compartments had different colored walls (black versus white) and also distinct floor textures (fine grid in the white compartment and wide grid in the black one). The floor in the central area was smooth and a little elevated with respect to the floors of the other compartments, with doors (14 cm height×8.5 cm width) that allowed the animal to pass through. Four infrared light beams in the entrance of each compartment of the box and six in the central area allowed the recording of the position of the animal and its crossings from one compartment to the other. When the animal interrupted the first beam at the entrance of one compartment and no beam was interrupted in the central area, the apparatus registered it as an entry, the location of the mouse always being known. The equipment was controlled by an IBM PC computer using MONPRE 2Z software (CIBERTEC, SA, Spain).

Drugs

Morphine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber, Toledo, Spain), naloxone hydrochloride (Laboratorios Abelló, Madrid, Spain), GHB (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA) and physiological saline (NaCl 0.9%) were used in these experiments. Drugs were diluted in physiological saline (0.1 mg/ml), at a constant volume (10 ml/kg) and administered IP.

Doses

To induce morphine dependence, a treatment with increasing morphine doses (6–12–25–50–100 mg/kg) every 24 h was administered to 28 groups ($n=8-11$). The highest dose (100 mg/kg) was achieved by day 5 and was maintained throughout the conditioning procedure (8 days); thus, animals received the highest morphine dose every day during the procedure. Six groups received an injection of physiological saline every 24 h. Naloxone was used at the dose of 0.25 mg/kg, with the exception of the dose–response curve study, in which a wide range of doses was used (from 0.031 to 1 mg/kg). To the corresponding groups, GHB was administered in a range of doses from 6 to 50 mg/kg (i.e. all except: Sal-Nal, M-Nal, and M-Nal-esp). Naloxone as well as GHB was administered at least 1 h after the daily morphine or saline administration.

Procedure

The experiment consisted of three phases, a description of which is presented in Table 1. During the first phase (pre-conditioning), mice were given access to both compartments of the apparatus for 1200 s (20 min) and the time spent by the animal in each compartment was recorded. Animals showing strong unconditioned aversion (less than 260 s) or preference (more than 780 s, except for the dose–response curve of naloxone, which was 900 s) for any compartment were discarded. One compartment was chosen to be paired with drug and the other with vehicle, taking into account that in each group half of the animals received the treatment in the most preferred compartment and the other half in the least preferred. After assigning the compartments, there were no significant differences between time spent in the naloxone-paired and the vehicle-paired compartments during the pre-conditioning phase. This is an important step in the experimental procedure of unbiased conditioning.

In the second phase (conditioning), which had a duration of 6 days, the animals received an injection of physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 20 min, and after an interval of 24 h they received an injection of the corresponding treatment (immediately before confinement for naloxone groups, or 30 min before for the GHB groups) in the drug-paired compartment for 20 min. In five non-dependent morphine groups, naloxone (Sal-Nal) or GHB (Sal-GHB6, Sal-GHB12.5, Sal-GHB25, and Sal-GHB50) was injected to verify the action of these compounds on morphine-naïve animals. In morphine-dependent groups, animals were injected with naloxone (M-Nal) or different GHB doses (M-GHB6, M-GHB12.5, M-GHB19, M-GHB25, M-GHB37.5, and M-GHB50), to verify whether these drugs were able to produce aversion by themselves.

In another four groups, to test the effects on the acquisition of naloxone-induced CPA, animals were injected with GHB 30 min before receiving naloxone (acquisition groups), to verify whether this drug was able to block the aversion induced by naloxone during the conditioning phase (GHB6acq, GHB12.5acq, GHB25acq, and GHB50acq).

During the third phase (post-conditioning), the guillotine door separating the two compartments was removed and the time spent by the untreated mice in each compartment was recorded for 1200 s of observation. In this final phase, all animals received a sole injection of morphine or saline in their home cage. There were only six groups in which animals also received GHB 30 min before the test session (expression groups) to determine whether this drug was able to block the expression of conditioned aversion induced by naloxone (GHB6exp, GHB12.5exp, GHB19exp, GHB25exp, GHB37.5exp, and GHB50exp). Furthermore, with the aim of verifying how removing morphine would affect the expression of conditioning, one group of dependent mice conditioned with naloxone did not receive morphine on the test day (M-Nal-Spt).

With the aim to further explore the effects of 25 mg/kg of GHB, an experiment was performed using four or five trials with naloxone and administering this dose during the expression phase of conditioning. The procedure was similar to that described above, but naloxone was administered in the drug-paired compartment in four or five sessions, the duration of this experiment being longer (10 and 12 days, respectively).

In this series of experiments, animals received different injection schedules depending on the phase. During the pre-conditioning, animals were administered only one injection of morphine or physiological saline 60 min before the test. Throughout the conditioning trials, mice received firstly, one injection of morphine or physiological saline 60 min before the test; secondly, in the appropriate groups (GHBacq groups), GHB 30 min before the test; and finally, naloxone or physiological saline immediately before confinement in the paired-compartment. In the test session, animals received one injection of morphine or physiological saline 60 min before the test and, in the appropriate groups (GHBexp groups), GHB 30 min before the test. Morphine and GHB administration took place in the animal room, naloxone being administered in the experimental room.

The difference in seconds between the times spent in the naloxone-paired compartment in the post-conditioning test and that spent in the pre-conditioning one is a measure of the degree of aversion induced by naloxone. If there is no difference, then the drug has blocked naloxone-induced CPA, while the opposite indicates that the drug cannot block this aversion.

Statistical analysis

Data of the time spent in the drug-paired compartment were analyzed with a mixed analysis of variance (ANOVA) with a between variable Treatments with a different number of levels (groups of treatment) depending on the experiment analyzed and a within variable days with two levels (pre-conditioning and post-conditioning test). To make post hoc comparisons Newman–Keuls and simple effects tests were used.

Experiment 2: physical syndrome of morphine withdrawal

Subjects

One hundred and three albino male mice of the OF1 strain, acquired in CRIFFA (Barcelona, Spain) were used in this second study. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups with the same characteristics as mentioned in the first experiment. The same drugs were also used.

Doses

The induction program of morphine dependence lasted for 11 days, with increasing doses (6, 12, 25, 50, and 100 mg/kg every 24 h) of morphine injected for 5 days until reaching the highest dose (100 mg/kg), which was maintained for 6 days more. Appropriate control groups received physiological saline for 11 days. In this second experiment, animals presented the same degree of morphine dependence as in the first one. The doses (100 mg/kg maximum dose) and duration of morphine administration (between 12 and 13 days of daily administration) were similar in both cases, which makes a comparison between them possible. A complete description of both treatment protocols is presented in Table 1. To confirm morphine withdrawal, naloxone (1 mg/kg) or saline was injected on the test day (V-V-V, V-V-Nal, M-V-V, M-V-Nal groups). With the aim of evaluating the effect of GHB on dependent animals, in three additional groups after the induction of morphine dependence, different doses of GHB were injected 30 min before the test (M-GHB25, M-GHB12.5, and M-GHB6 groups). In three more groups, the same drugs were administered 30 min before the naloxone injection (M-GHB25-Nal, M-GHB12.5-Nal, and M-GHB6-Nal groups), to show the effect of GHB on the intensity of physical naloxone-induced withdrawal syndrome. To evaluate the GHB action on spontaneous withdrawal, in four groups, after the same induction program, morphine administration was discontinued and 48 h later, behavior was evaluated (M-V-Spt, M-GHB6-Spt, M-GHB12-Spt, and M-GHB25-Spt). With the aim of determining the duration of the GHB effect on this kind of withdrawal, an evaluation of physical withdrawal signs was made 30 min, 3, 6, 12, and 24 h after GHB injection. The effect of chronic GHB administration to test for the appearance of physical signs of morphine withdrawal was evaluated in additional groups (Chronic-V, Chronic-GHB 6, Chronic-GHB 12, and Chronic-GHB 25) receiving 11 daily administrations of different GHB doses (6, 12, and 25 mg/kg). All drugs were dissolved in physiological saline (NaCl 0.9%), the volume of injected drug (10 ml/kg) being constant.

Procedure

The day on which the behavioral test took place, animals were weighed and afterwards all experimental groups received three injections according to the treatment: firstly, morphine or physiological saline 60 min before the test; secondly, GHB or physiological saline 30 min before the test; and finally, naloxone or physiological saline immediately before the behavioral test. The same protocol was followed in spontaneous withdrawal with no administration of naloxone. Morphine and GHB administration took place in the animal room, naloxone being administered in the experimental room. Behavior was video-recorded for 20 min using white light, and 40 min after the

end of the test (1 h after naloxone or physiological saline injection) animals were weighed again.

Behavioral analysis

The experimenter, blind as to animal treatments, evaluated the videotapes to assess behavioral patterns using a microprocessor (PC computer) and a modified custom-developed program (Brain et al. 1989) that allowed estimation of times allocated to different behaviors. The behaviors evaluated, based on the description of Fernandez-Espejo et al. (1995), were the following: paw tremor (the mouse shakes its paws with lateral movements), body shakes (the mouse shakes its body), jumping (all feet losing contact with the ground), body care (the mouse licks or scratches its fur or paws and cleans its face with the forepaws), genital grooming (the mouse licks its genitalia), ptosis (closing of the eyelids), piloerection (erection of the hair), and diarrhea (presence of soft stool). The frequency of paw tremor, body shakes, and jumping, and the time spent in body care or genital grooming was evaluated. Ptosis, piloerection, and diarrhea were checked for their presence. In addition to these behaviors, percentage of weight loss was measured.

Furthermore, a score for each group was calculated using a modification of the scale described by Gellert and Holtzman (1978), in which two classes of signs were distinguished. Graded signs were: weight loss (each 1% of weight loss quantified as 1); number of jumps (1–4 quantified as 1, 5–9 quantified as 2, and >10 quantified as 3); number of body shakes (1–2 quantified as 2, >3 quantified as 4). Checked signs, in which only the presence or absence was evaluated, were: diarrhea (2), ptosis (2), abnormal posture, considered as an emotional response to handling, emission of audible vocalizations or trying to escape when experimenter holds the animal and the presence of greater immobility than control animals (3), and erection or ejaculation (genital grooming) (3). For more details see Broseta et al. (2001).

Statistical analyses

Non-parametric statistics were performed for all behavioral patterns. Kruskal–Wallis tests were used to assess the variance of the behavioral measures over groups using the medians for times allocated to each behavioral category. The two-tailed Mann–Whitney *U*-test then examined the differences between the experimental groups. Data concerning the Gellert–Holtzman scale were analyzed by an analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons (Newman–Keuls) were subsequently carried out.

Results

Experiment 1: conditioned place aversion

For the dose–response curve of naloxone (see Fig. 1), ANOVA revealed that the variable Days [$F(1,6)=24.027$; $P<0.001$] and the interaction [$F(6,54)=2.921$; $P<0.01$] were significant. The variable Treatment was not significant [$F(6,54)=0.719$; $P<0.6357$]. Post hoc comparisons indicated the effect of days was significant for animals conditioned with 0.125 ($P<0.006$), 0.25 ($P<0.009$), 0.05 ($P<0.001$), and 1 mg/kg ($P<0.001$) of naloxone, which spent less time in the drug-paired compartment in post-conditioning in comparison to pre-conditioning test.

In groups conditioned with GHB (see Fig. 2), ANOVA revealed that the variable Days [$F(1,12)=1.930$; $P<0.01$] and the interaction [$F(12,113)=1.930$; $P<0.03$] were significant. The variable Treatment was not significant [$F(12,113)=1.004$; $P<0.4501$]. Post hoc comparisons indicated that the effect of days was significant for morphine-dependent animals conditioned with 250 mg/kg naloxone (M-Nal and M-Nal-Spt, $P<0.004$ and $P<0.01$, respectively) and for those conditioned with 25 mg/kg GHB (M-GHB25, $P<0.01$), which spent less time in the drug-paired compartment in post-conditioning in comparison with the pre-conditioning test.

When GHB was administered in the acquisition phase of the conditioning (see Fig. 3), ANOVA revealed that the variable Treatment [$F(3,32)=3.053$; $P<0.04$] and the interaction [$F(3,32)=4.859$; $P<0.006$] were significant. The variable Days was not significant [$F(1,3)=2.741$; $P<0.1076$]. Post hoc comparisons indicated that the effect of days were significant for animals conditioned with 6 mg/kg GHB (GHB6acq, $P<0.001$), which spent less time

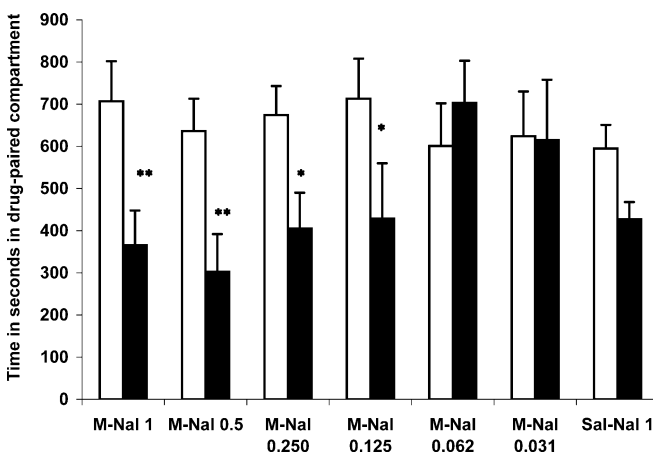


Fig. 1 Means values (\pm SEM) of the dose–response curve of naloxone in conditioned place aversion: M-Nal 0.031 ($n=8$), M-Nal 0.062 ($n=9$), M-Nal 0.125 ($n=9$), M-Nal 0.250 ($n=9$), M-Nal 0.5 ($n=9$), M-Nal 1 ($n=9$), Sal-Nal 1 ($n=8$). The bars represent the time in seconds spent in the naloxone-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars). * $P<0.01$, ** $P<0.001$, significant difference in time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning versus post-conditioning tests

in the drug-paired compartment in post-conditioning in comparison to pre-conditioning test.

When GHB was administered in the phase of expression (post-conditioning test) of the conditioning (see Fig. 3), ANOVA revealed that the variable Treatment [$F(5,52)=0.808$; $P<0.5492$], Days [$F(1,5)=0.705$; $P<0.3659$] and the interaction [$F(5,52)=0.705$; $P<0.6225$] were not significant.

ANOVA for four or five trials (M-Nal 4 and M-Nal 5) revealed that the variable Days [$F(1,3)=7.369$; $P<0.01$] and the interaction [$F(3,32)=3.326$; $P<0.01$] were significant. The variable Treatment was not significant [$F(3,32)=2.555$; $P<0.07$]. Post hoc comparisons revealed that animals conditioned with 250 mg/kg naloxone four or five trials developed a strong aversion for the drug-paired compartment ($P<0.1$ and $P<0.003$, respectively), this not being the case when 25 mg/kg of GHB was administered in the post-conditioning test.

Experiment 2: physical syndrome of morphine withdrawal

In addition to the Gelert–Holtzman scale scores obtained, results regarding three specific behaviors (paw tremor, body shakes and jumping) are presented. These behaviors have been chosen on the basis of previous studies (Brosetta et al. 2001) which demonstrated that these three are specific for morphine withdrawal in mice.

Paw tremor

Paw tremor (see Table 2) was observed only after naloxone administration in all the morphine-treated animals (Kruskal–Wallis $P<0.001$), these groups showing a significant increase in comparison with controls ($P<0.002$ in all cases). In addition, the M-V-Nal group showed a significant increase in this behavior when compared with the rest of the groups (Mann–Whitney U -test, $P<0.02$ for M-GHB6-Nal and M-GHB12-Nal; and $P<0.002$ for the rest). In spontaneous withdrawal (see Table 3), the two higher GHB doses (12.5 and 25 mg/kg) significantly decreased this sign (Kruskal–Wallis $P<0.001$), in comparison with controls, but only when tested 30 min after GHB administration ($P<0.002$). In control mice experiencing spontaneous withdrawal, paw tremor significantly decreased 12 h after the first evaluation, 30 min after GHB injection ($P<0.002$ with respect to the first evaluation).

Body shakes

Naloxone administration induced body shakes (see Table 2) in all morphine-treated animals (Kruskal–Wallis, $P<0.001$), when compared with saline-treated groups ($P<0.05$ for M-GHB6, M-GHB12, and M-GHB25; and $P<0.002$ for M-V-Nal). Similar to paw tremor, M-V-Nal

Table 2 Median values with percentile range of the number of jumping, body shakes and paw tremor and the Gellert–Holtzman scale scores (means±SEM) during a 20-min observation period: V-V ($n=8$), M-V-V ($n=8$), V-V-Nal ($n=8$), M-V-Nal ($n=7$), M-GHB6-Nal ($n=10$), M-GHB12-Nal ($n=7$), M-GHB25-Nal ($n=7$), M-GHB6-V ($n=10$), M-GHB12-V ($n=10$), M-GHB25-V ($n=8$)

	Jumping	Paw tremor	Body shakes	G-H score
V-V-V	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	4.2±0.8
M-V-V	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	6.3±0.7
V-V-Nal	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	4.7±0.6
M-V-Nal	2*** (1–12)	42*** (22–77)	2*** (0–3)	14.2±1.3**
M-GHB6-Nal	0 (0–0)	12*** (7–16)	1* (0–2)	10.1±1.5**
M-GHB12-Nal	0 (0–0)	15*** (6–24)	0* (0–1)	12.3±1**
M-GHB25-Nal	0 (0–0)	5*** (3–7)	0* (0–1)	7.7±1.3
M-GHB6-V	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	1.8±0.4
M-GHB12-V	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	2±0.5
M-GHB25-V	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	4.7±0.6

Mann–Whitney *U*-test: differs from V-V-V group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.002$

group presented more shakes than the rest of dependent groups (Mann–Whitney *U*-test, $P<0.05$ for M-GHB6-Nal; $P<0.02$ for M-GHB12-Nal; and $P<0.002$ for the rest). In spontaneous withdrawal (see Table 3), the two higher GHB doses (12.5 and 25 mg/kg) significantly decreased this sign (Kruskal–Wallis $P<0.001$) in comparison with controls when tested 30 min and 3 h after GHB administration ($P<0.002$). In control mice which experienced spontaneous withdrawal, body shakes significantly

decreased 12 h after the first evaluation, 30 min after the GHB injection ($P<0.002$ respect to the first evaluation)

Jumping

Jumping (see Table 2) was observed in M-V-Nal (Kruskal–Wallis $P<0.001$), this difference being significant with respect to the control group (Mann–Whitney

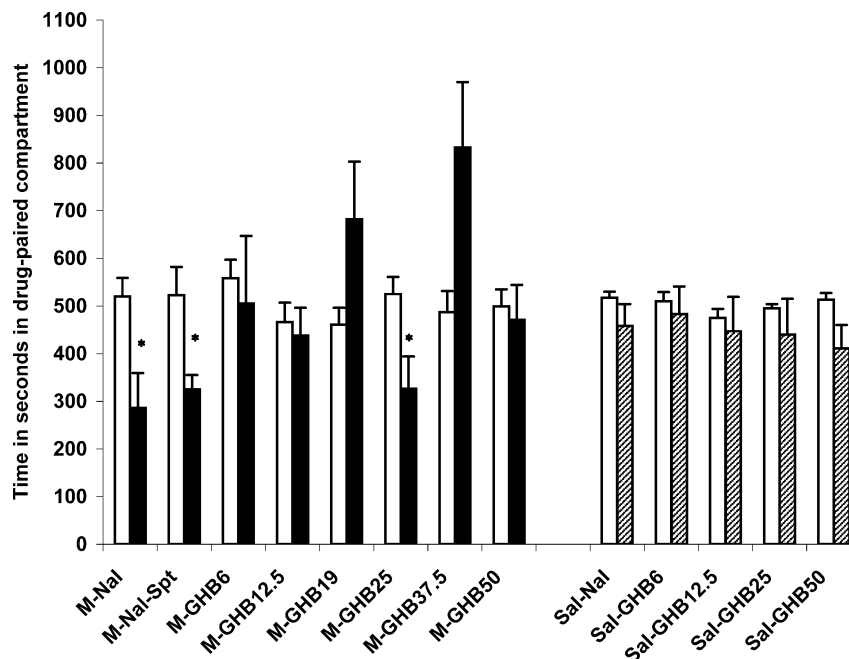


Fig. 2 Means values (±SEM) of the effect of naloxone and GHB on conditioned place aversion. During the phase of conditioning animals were divided into two groups: **a** morphine-dependent animals, which received saline in one compartment and 0.25 mg/kg naloxone (M-Nal and M-Nal-Spt, $n=10$ both groups), 6, 12.5, 19, 25, 37.5, or 50 mg/kg GHB (M-GHB6, M-GHB12.5, M-GHB19, M-GHB 25, and M-GHB37.5, $n=10$ all groups, and M-GHB50, $n=9$) in the other compartment; and **b** saline-treated animals undergoing the same conditioning procedure (Sal-Nal, Sal-

GHB12.5, Sal-GHB 25 and Sal-GHB50, $n=10$ all groups). The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars for animals with morphine dependence and dashed bars for saline-treated animals). * $P<0.01$, significant difference in time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning versus post-conditioning tests

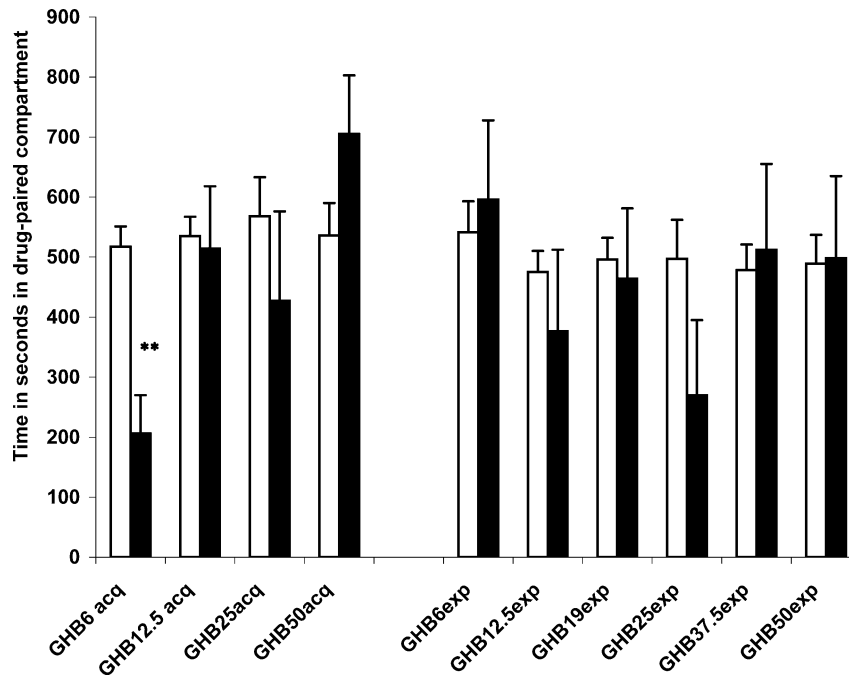


Fig. 3 Means values (\pm SEM) of the effect of GHB on acquisition and expression of conditioned place aversion. During the phase of conditioning, morphine-dependent animals received saline in one compartment and 0.25 mg/kg naloxone plus 6, 12.5, 25, or 50 mg/kg GHB (GHB6 acq, $n=10$, GHB12.5 acq, $n=8$, GHB25 acq, $n=10$, and GHB50 acq, $n=8$) in the other. In other morphine-dependent animals conditioned with saline in one compartment and 0.25 mg/kg naloxone in the other, GHB was administered (6, 12.5, 19, 25, 37.5,

or 50 mg/kg) 30 min before the test (GHB6exp, $n=10$, GHB12.5exp, $n=9$, GHB19exp, $n=10$, GHB25exp, $n=9$, GHB37.5exp, $n=10$, and GHB50exp, $n=10$). The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars). ** $P<0.001$, significant difference in time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning versus post-conditioning tests

Table 3 Median values with percentile range of the number of body shakes, paw tremor, and jumping in animals suffering spontaneous withdrawal during a 20-min observation period: M-V-Spt ($n=10$), M-GHB 6-Spt ($n=10$), M-GHB 12-Spt ($n=10$), M-GHB 25-Spt ($n=10$)

	30 min	3 h	6 h	12 h
Paw tremor				
M-V-Spt	13 (3–31)	21 (6–55)	11 (4–70)	0 (0–12)
M-GHB 6-Spt	8 (0–17)	20 (0–35)	14 (0–72)	0 (0–9)
M-GHB 12-Spt	1*** (0–6)	19 (7–45)	14 (8–25)	0 (0–18)
M-GHB 25-Spt	0*** (0–0)	13 (0–33)	14 (7–34)	0 (0–0)
Body shakes				
M-V-Spt	1 (0–15)	1 (0–2)	0 (0–2)	0 (0–1)
M-GHB 6-Spt	0 (0–2)	0 (0–2)	0 (0–1)	0 (0–0)
M-GHB 12-Spt	0*** (0–1)	0** (0–2)	0 (0–1)	0 (0–0)
M-GHB 25-Spt	0*** (0–0)	0** (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)
Jumping				
M-V-Spt	0 (0–5)	2 (0–35)	11 (0–26)	0 (0–3)
M-GHB 6-Spt	0 (0–4)	0 (0–17)	2 (0–14)	0 (0–0)
M-GHB 12-Spt	0 (0–0)	1 (0–22)	1 (0–13)	0 (0–0)
M-GHB 25-Spt	0 (0–0)	0 (0–24)	0 (0–36)	0 (0–0)

Mann–Whitney U -test: differs from M-V-Spt group, * $P<0.05$, ** $P<0.002$

$P<0.002$) and the rest of the groups (Mann–Whitney $P<0.02$ for V-V-Nal, M-GHB6-Nal and M-GHB12-Nal; and $P<0.002$ for the rest).

Gellert–Holtzman scale

Results obtained with the Gellert–Holtzman scale are represented graphically in Fig. 4. The ANOVA showed that the variable treatment was significant [$F(11,91)=23.175$; $P<0.0001$]. A post hoc comparison with the Newman–Keuls test indicated that naloxone administration to morphine-dependent mice (M-V-Nal) and those dependent groups which received 12.5 or 6 mg/kg GHB presented a significant increase in the score of this scale with respect to control group ($P<0.01$). Additionally, M-V-Nal groups also presented a significant score when compared with the other groups, except M-GHB12.5-Nal ($P<0.05$ for M-GHB6-Nal and $P<0.01$ for the rest).

Chronically administered GHB (see Table 4) did not induce appreciable signs of withdrawal in any of the behaviors evaluated, either 24 or 48 h following the last drug administration. The Gellert–Holtzman scores were similar to those of the control group.

Table 4 Means (\pm SEM) of Gellert–Holtzman score of animals withdrawn from chronic GHB administration: Chronic-V ($n=10$), Chronic-GHB 6 ($n=10$), Chronic-GH 12 ($n=8$), Chronic-GHB 25 ($n=10$)

	G-H score	
	24jh	48jh
Chronic-V	3.9 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2
Chronic-GHB 6	3.5 \pm 0.5	3.9 \pm 0.5
Chronic-GH 12	4.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2
Chronic-GHB 25	2.74 \pm 0.5	2.9 \pm 0.5

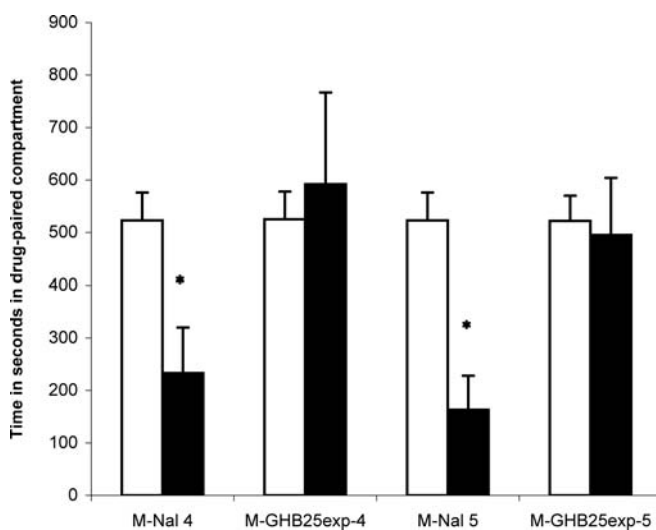


Fig. 4 Means values (\pm SEM) of the effect of 25 mg/kg GHB on naloxone-induced place aversion after four or five trials: M-Nal 4, M-GHB25exp-4, M-Nal 5, M-GHB25exp-5 ($n=9$ in all groups). The bars represent the time in seconds spent in the naloxone-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (dark bars). * $P<0.01$, significant difference in time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning versus post-conditioning tests

Discussion

Several studies in human addicts to alcohol or opiates have reported that GHB administration can ameliorate symptoms of withdrawal from these drugs (Gallimberti et al. 1989, 1992, 2000; Beardsley et al. 1996). In the present study, these observations in humans have been confirmed and extended in morphine-dependent mice. GHB has proved to be a useful tool to ameliorate both physical and motivational aspects of morphine withdrawal symptoms. Administered during the phase of acquisition or expression of CPA induced by naloxone in dependent animals, GHB has been capable of firmly counteracting this aversion. On the other hand, it also reduces the intensity of physical signs of the morphine withdrawal syndrome measured with the modified Gellert–Holtzman scale. Its effects on specific behaviors (jumping, paw tremor, or body shakes) also confirm this beneficial action. However, evaluation of its effects on spontaneous morphine with-

drawal show that this action is short-lasting, no more than 3 h, which can reduce its potential use in human addicts.

One of the most widely employed models to evaluate motivational aspects of withdrawal is the conditioned place paradigm, which is considered a reliable and sensitive index of the aversive motivational state accompanying withdrawal from acute opioid dependence (Azar et al. 2003). Administration of GHB to saline-treated animals does not induce either preference or aversion with our laboratory model of conditioned preference. There is no agreement regarding the rewarding properties of GHB. In contrast with opioids, a greater number of trials seems to be required before preference can be observed after GHB administration (Martellota et al. 1997; Itzhak and Ali 2002) using higher doses than those in our study. Thus, in some circumstances GHB seems to be able to induce positive reinforcing effects in drug-naïve mice.

Different results have been found when GHB was administered to morphine-dependent animals. Although the high and low doses do not show effects, the intermediate (25 mg/kg) induces a clear place aversion. Doses below and over 25 mg/kg (19 and 37.5 mg/kg) do not present motivational effects and efficiently block the expression of naloxone-induced CPA. No previous studies have been performed with respect to the effect of GHB administration on non-abstinent dependent animals. The neurobiological state of a morphine-dependent animal is dramatically different from that which is non-dependent, thus, it could be expected that GHB administration would produce different motivational consequences. The fact that only this intermediate dose induces aversion could be due to different causes, such as different percentage of high or low affinity receptor occupancy or its influence on dopaminergic neurotransmission. DA antagonists or DA release inhibitors block morphine-induced place preference (Manzanedo et al. 2001a,b) and by the same mechanisms GHB could induce aversion in morphine-dependent mice. When CPA is induced using a greater number of naloxone-induced aversion trials, 25 mg/kg GHB blocks this aversion. These results demonstrate that at this dose, GHB exhibits its effects depending on the characteristics of the conditioning procedure.

In this study, it has been confirmed that naloxone, at the dose of 0.250 mg/kg, induces CPA in morphine-dependent mice. During the phase of acquisition, when GHB is co-administered with the opiate antagonist, doses up to 12.5 mg/kg completely block the development of naloxone-induced place aversion. Administered during the phase of expression, in a situation in which the place aversion has been normally acquired with naloxone, GHB seems to be even more potent since, all the doses block CPA. These results confirm that GHB is able to inhibit the motivational component of morphine withdrawal.

When physical signs of morphine withdrawal are studied, GHB is also effective in decreasing the intensity of these signs to near control levels. The modified Gellert–Holtzman scale shows that the dose of 25 mg/kg ameliorates the intensity of the physical syndrome, this improvement also being evident when separate behaviors

are observed. Jumping disappears with any of the doses used, and although GHB decreases the frequency of body shakes or paw tremor, it does not reach control levels. It has to be taken into consideration that jumping is scarcely observed, since this sign does not present, with our experimental conditions, a lineal relationship with intensity of dependence (Broseta et al. 2001). Differences are observed respecting the 25 mg/kg dose of GHB, since it does not affect the expression of CPA but efficiently alleviates signs of physical morphine withdrawal. The neurobiological basis of physical and motivational consequences of morphine withdrawal is different; even different brain structures are involved in it (Stinus et al. 1990; Maldonado et al. 1992). CPA can be induced at doses that do not produce appreciable physical signs (as in the present work) and the onset and magnitude of physical withdrawal symptoms are not in correlation with place aversion conditioning (Mucha 1987; Higgins and Sellers 1994), thus, these discrepant results are not surprising. Another possibility to explain the differences observed with the 25 mg/kg dose of GHB is the fact that naloxone, although at doses higher than those used in these experiments, is capable of inducing CPA in the absence of morphine. Thus, the possibility that the CPA observed is not actually related to withdrawal has to be taken into consideration. In spontaneous withdrawal, although the intensity of the signs observed is faint in comparison with naloxone-induced withdrawal, GHB decreases most behaviors studied, i.e. paw tremor and body shakes. However, this effect is short-lasting, with a maximum of 3 h for body shakes and only 30 min for paw tremor. These results are in agreement with those found by Gallimberti et al. (1993, 1994, 2000) who reported the short-lasting effect of GHB in humans, around 2–3 h, the same as in mice. On the other hand, administration of GHB to dependent mice does not induce any appreciable signs of withdrawal. Our results are in agreement with those observed in clinical studies. In human addicts to opiates, GHB has proved to be useful in the treatment of the withdrawal syndrome (Gallimberti et al. 1993, 1994, 2000), these results also being confirmed in ethanol addicts (Gallimberti et al. 1989, 2000).

The use of different naloxone doses (lower for CPA studies) allows the dissociation of the aversive properties of precipitated withdrawal from the somatic signs. Thus, CPA may be reflecting only the negative affective state and dysphoria associated with opiate withdrawal. Taken together, our results show that GHB administration reduces both motivational as well as physical aspects of morphine withdrawal. Its multiple effects on different neurotransmitter systems make it difficult to give a simple explanation of its mechanism of action. Due to the important role played by DA in morphine withdrawal, this neurotransmitter system could be the one that is most directly involved. Depending on the dose used, GHB could induce activation (Diana et al. 1996) or diminution (Feigenbaum and Howard 1997) of DA neurotransmission.

In addition to these effects on the DA system, the potentiating effect of GHB on the endogenous opioid system activity could also ameliorate morphine withdrawal (Maitre 1997). GHB and morphine induce a number of similar effects, although opiate receptors seem not to be involved (Feigenbaum and Simantov 1996). In addition, a GHB-induced accumulation of met-enkephalin and pro-enkephalin mRNA expression in the striatum has been reported to be possible through a nigrostriatal, dopamine-mediated mechanism (Gobaille et al. 1994; Schmidt-Mutter et al. 1999). Clinical reports are also not indicative of true cross-dependency between GHB and opiates (Winter 1981; Gallimberti et al. 1993). Many other neurotransmitters, like serotonin or GABA, are affected after GHB administration. GHB binds to GABA_b receptor (Maitre 1997) and it is well established that GABA_b agonists such as baclofen attenuate morphine withdrawal signs and restore low DA brain levels observed during withdrawal (Bexis et al. 2001; Diaz et al. 2003). Thus, it has to be taken into consideration that the improvement in morphine withdrawal induced by GHB could be through an action on the GABA system.

In conclusion, our results support the idea that GHB is capable of ameliorating both the physical as well as motivational aspects of morphine withdrawal. This drug could be useful for the treatment of human heroin addicts, although in the light of studies concerning its potential risk of abuse, precautions must be taken into consideration. Many reports have shown that GHB is illicitly used and its prolonged administration could include the development of tolerance and physical dependence (Dyer 1991; Chin et al. 1992; Frederick et al. 1994; Stephens and Baselt 1994; Friedman et al. 1996; Galloway et al. 1997; Craig et al. 2000). Since 2000, GHB has been classified as a schedule-I drug under the US's Controlled substances Act in recognition of its growing abuse liability (Drug Enforcement Agency 2000). Despite this, GHB can be considered as a useful tool for the treatment of opiate abuse, taking into consideration that doses below sedative action seem to be sufficient to obtain this effect.

Acknowledgements This research was supported by the following grants: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Dirección General de Investigación and FEDER (Ref BSO2002-00106); Instituto de Salud "Carlos III" (FIS), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (G03/005); and Dirección General de Drogodependencias (Proyecto de Investigación en materia de drogodependencias y otras adicciones, 2003), Conselleria de Bienestar Social, Generalitat Valenciana, Spain. We wish to thank Ms. Miriam Phillips for the English revision of the manuscript.

References

- Azar MR, Jones BC, Schulteis G (2003) Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. *Psychopharmacology* 170:42–50
- Beardsley PM, Balster RL, Harris LS (1996) Evaluation of the discriminative stimulus and reinforcing effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB). *Psychopharmacology* 127:315–322

- Bexis S, Ong J, White J (2001) Attenuation of morphine withdrawal signs by the GABA_B receptor agonist baclofen. *Life Sci* 70:395–401
- Brain PF, McAllister KH, Wamsley SV (1989) Drug effects on social behaviours. In: Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ (eds) *Methods in ethopharmacology*. Neuromethods series, vol 13. Humana Press, Clifton, pp 687–739
- Broseta I, Rodríguez-Arias M, Stinus L, Miñarro J (2001) Ethological analysis of morphine withdrawal with different dependence programs in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:335–347
- Broughton R, Mamelak M (1979) The treatment of narcolepsy-catalepsy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci* 6:1–6
- Cheramy A, Nieouillon A, Glowinski J (1977) Stimulating effects of γ -hydroxybutyrate on dopamine release from the caudate nucleus and the substantia nigra of the cat. *J Pharmacol Exp Ther* 202:283–293
- Chin MY, Kreutzer RA, Byer JE (1992) Acute poisoning from gammahydroxybutyrate in California. *West J Med* 156:380–384
- Craig K, Gomez HG, McManus JL, Bania TC (2000) Severe gamma-hydroxybutyrate withdrawal: a case report and literature review. *J Emerg Med* 18:65–70
- Diana M, Mereu G, Mura A, Fadda F, Passino N, Gessa GL (1991) Low doses of γ -hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* 566:208–211
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa G (1996) Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: evidence of protracted abstinence. *Neuroscience* 71:411–415
- Diaz SL, Kemmling AK, Balerio GN (2003) Baclofen reestablishes striatal and cortical dopamine concentrations during naloxone-precipitated withdrawal. *Neurochem Int* 42:293–298
- Dyer JE (1991) Gamma hydroxybutyrate: a health-food product producing coma and seizure like activity. *Am J Emerg Med* 9:321–324
- Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Fratta W (2000) Gamma-hydroxybutyric acid an evaluation of its rewarding properties in rats and mice. *Alcohol* 20:247–256
- Feigenbaum JJ, Howard SG (1997) Naloxone reverses the inhibitory effect of γ -hydroxybutyrate on central DA release in vivo in awake animals: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 224:71–74
- Feigenbaum JJ, Simantov R (1996) Lack of effect of gamma-hydroxybutyrate on mu, delta and kappa opioid receptor binding. *Neurosci Lett* 212:5–8
- Fernandez-Espejo E, Cador M, Stinus L (1995) Ethopharmacological analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rats: a newly-developed “etho-score.”. *Psychopharmacology* 122:122–130
- Frederick SL, Galloway GP, Staggers F, Stalcup SA, Smith D (1994) Gamma-hydroxybutyrate: a putative neurotransmitter that is abused and causes physical dependence. In: Harris LS (ed) *Problems of drug dependence, 1994*. National Institute on Drug Abuse Research Monograph Series 153. National Institute on Drug Abuse, Rockville, p 101
- Friedman J, Westlake R, Furman M (1996) “Grievous bodily harm”: gamma hydroxybutyrate abuse leading to a Wernicke–Korsakoff syndrome. *Neurology* 46:469–471
- Gallimberti L, Canton G, Gentile N, Ferri M, Cibir M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL (1989) Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Lancet* 2:787–789
- Gallimberti L, Ferri M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL (1992) Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double-blind study. *Alcohol Clin Exp Res* 16:673–676
- Gallimberti L, Cibir M, Pagnin P, Sabbion R, Pani PP, Pirastu R, Ferrara SD, Gessa GL (1993) Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opioid withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology* 9:77–81
- Gallimberti L, Schifano F, Forza G, Miconi L, Ferrara SD (1994) Clinical efficacy of gamma-hydroxybutyric acid in treatment of opiate withdrawal. *Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci* 244:113–114
- Gallimberti L, Spella MR, Soncini CA, Gessa GL (2000) Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol and heroin dependence. *Alcohol* 20:257–262
- Galloway GP, Frederick SL; Staggers FE, Gonzales M, Stalcup SA, Smith DE (1997) Gamma-hydroxybutyrate: an emerging drug of abuse that causes physical dependence. *Addiction* 92:89–96
- Gellert VF, Holtzman SG (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* 205:536–546
- Gobaille S, Schmidt C, Cupo A, Herbrecht F, Maitre M (1994) Characterization of methionine-enkephalin release in the rat striatum by in vivo dialysis: effects of gamma-hydroxybutyrate on cellular and extracellular methionine-enkephalin levels. *Neuroscience* 60:637–648
- Hechler V, Gobaille S, Bourguignon J, Maitre M (1991) Extracellular events induced by γ -hydroxybutyrate in striatum: a microdialysis study. *J Neurochem* 56:938–944
- Higgins GA, Sellers EM (1994) Antagonist-precipitated opioid withdrawal in rats: evidence for dissociations between physical and motivational signs. *Pharmacol Biochem Behav* 48:1–8
- Howard SG, Feigenbaum JJ (1997) Effect of gamma-hydroxybutyrate on central dopamine release in vivo. *Biochem Pharmacol* 53:103–110
- Itzhak Y, Ali SF (2002) Repeated administration of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) to mice: assessment of the sedative and rewarding effects of GHB. *Ann N Y Acad Sci* 965:451–460
- Laborit G, Larcan A, Kind A (1962) Le gamma-hydroxybutyrate en anesthésie neuro-chirurgicale. *Neurochirurgie* 8:104–107
- Maitre M (1997) The γ -hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* 51:337–361
- Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF (1992) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 261:669–677
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001a) Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 121:189–197
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001b) Effects of CGS 10746B on hyperactivity and place preference induced by morphine. *Behav Brain Res* 126:23–32
- Martellotta MC, Fattore L, Cossu G, Fratta W (1997) Rewarding properties of gamma-hydroxybutyric acid: an evaluation through place preference paradigm. *Psychopharmacology* 132:1–5
- Mucha RF (1987) Is the motivational effect of opiate withdrawal reflected by common somatic indices of precipitated withdrawal? A place conditioning study in rats. *Brain Res* 418:214–220
- Popik P, Danysz W (1997) Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine. *J Pharmacol Exp Ther* 280:854–865
- Schmidt-Mutter C, Gobaille S, Muller C, Maitre M (1999) Prodynorphin and proenkephalin mRNAs are increased in rat brain alters acute and chronic administration of gamma-hydroxybutyrate. *Neurosci Lett* 262:65–68
- Stephens BG, Baselt RC (1994) Driving under the influence of GHB? *J Anal Toxicol* 18:357–358
- Stinus L, Le Moal M, Koob GF (1990) Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience* 37:767–773
- Vayer P, Mandel P, Maitre M (1987) Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* 41:1547–1557
- Winter JC (1981) The stimulus properties of γ -hydroxybutyrate. *Psychopharmacology* 73:372–375

Estudio 6



Estudio 6: El ácido Gamma-hidroxitútrico afecta la adquisición y la reinstauración de la preferencia de lugar inducida por cocaína en ratones.

Investigación original: Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, Ana Castillo, María A. Aguilar, José Miñarro (2006). Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behavioural Pharmacology* 17:119–131

El ácido Gamma-hidroxitútrico (GHB) pertenece a las denominadas "club drugs" o drogas de discoteca, siendo utilizado como sustancia de abuso por sus efectos eufóricos, sedativos y anabólicos. El GHB es un metabolito del ácido gamma-aminobutírico (GABA), siendo una sustancia que se encuentra de forma natural en el cerebro. Numerosas investigaciones han sugerido que el GHB puede interferir con los sistemas cerebrales responsables del refuerzo producido por las sustancias de abuso así como en la expresión de los cambios neuroadaptativos que ocurren durante el proceso de dependencia. Aunque no existe un acuerdo unánime, el GHB parece incrementar la transmisión dopaminérgica. Si bien algunos investigadores han observado una activación del sistema dopaminérgico tras la administración de este compuesto, igualmente se han descrito resultados opuestos. En un reciente estudio se ha observado que el GHB induce una leve excitación de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV), sugiriéndose que este compuesto afectaría al sistema de recompensa a través de su acción sobre los receptores GABA_B.

El consumo de cocaína se encuentra muy extendido en nuestra población y frecuentemente se asocia a problemas tanto de tipo médico, como psicológico o social. En realidad, los adictos a la cocaína son a

menudo poli-consumidores, observándose desde 1999 un aumento de consumidores de cocaína y GHB. Estas drogas comparten acciones neurofisiológicas comunes sobre las neuronas de dopamina (DA), aumentando la liberación de DA en las regiones terminales de estas neuronas, especialmente en el núcleo accumbens. En las dos últimas décadas se han probado multitud de compuestos farmacológicos con el fin de evaluar su eficacia durante la abstinencia y la prevención de la recaída en los adictos a la cocaína. Entre ellos, sustancias que actúan sobre la DA, opioides, bloqueadores de los canales de calcio o diferentes antidepresivos. El incremento en los niveles de GABA en la hendidura sináptica podría reducir el incremento de DA inducidos por los psicoestimulantes en el núcleo accumbens, consiguiendo con ello disminuir sus propiedades reforzantes. La Gabapertina, que aumenta la liberación de GABA, reduce de forma perceptible la cantidad y frecuencia del deseo (craving) que sufren los pacientes adictos a la cocaína. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios existentes, hasta la fecha no existen datos concluyentes que apoyen la eficacia de ningún compuesto farmacológico en la prevención de la recaída en el consumo de cocaína. Recientemente, gracias a los resultados obtenidos en una serie de estudios clínicos con individuos dependientes del alcohol o la heroína, se ha otorgado un papel al GHB como posible herramienta en el tratamiento de las drogodependencias. Este compuesto, administrado oralmente, reduce el deseo intenso y el malestar asociado con la abstinencia al alcohol y a los opiáceos. No obstante, hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio en sujetos adictos a cocaína.

El objetivo principal del presente trabajo es evaluar el efecto de la administración de GHB sobre las acciones reforzantes de la cocaína. Ya que ambas drogas actúan de una manera similar sobre la neurotransmisión DA, cabría esperar un efecto aditivo. Por otra parte, ya que el GHB ha demostrado ser eficaz como herramienta terapéutica para mejorar el deseo y la abstinencia al alcohol y los opiáceos, sugerimos que podría disminuir la

reinstauración de la búsqueda de cocaína. Con el fin de comprobar esta hipótesis se ha utilizado el procedimiento de condicionamiento de lugar, que ha sido empleado de forma eficaz para determinar las características reforzantes de la cocaína. La capacidad de las señales asociadas a la droga para inducir el deseo intenso y la recaída en el comportamiento de búsqueda de la droga es uno de los mecanismos por los cuales la adicción se mantiene. La técnica de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) permite estudiar las características de recompensa o incentivo de las drogas en animales libres de fármaco, al evaluar el tiempo que pasan en un ambiente previamente asociado con los efectos de la misma. Esta prueba puede representar una herramienta útil para evaluar la sensibilidad individual a las características incentivas de las sustancias adictivas.

Recientemente, el procedimiento de condicionamiento de la preferencia de lugar se ha empleado para estudiar la recaída en la conducta de búsqueda de la droga, siendo la morfina y la cocaína las sustancias más estudiadas. Tras haberse establecido un CPL, esta preferencia es extinguida gradualmente por la exposición repetida de los animales al compartimento asociado con la droga en un estado libre de fármaco. Una vez extinguido el CPL, diversos factores como inyecciones de la droga o estrés, pueden reinstaurar de nuevo esta preferencia. En el presente estudio, estudiamos el CPL inducido por la cocaína tras aparear esta droga junto con diversas dosis de GHB, tanto en la fase de adquisición como en la de expresión del condicionamiento. Una vez que el CPL fue establecido, la preferencia fue extinguida tras repetidos ensayos del test, en los cuales los animales fueron expuestos a ambos compartimentos en un estado libre de fármaco. Al final del procedimiento de extinción, se procedió a restablecer la preferencia de lugar administrando, según el grupo experimental, una dosis de cocaína que correspondería a la mitad de la dosis empleada para inducir el condicionamiento, diferentes dosis de GHB o ambas drogas juntas.

Para los experimentos de CPL, se utilizaron cuatro cajas idénticas de "Plexiglás", con dos compartimentos de igual tamaño, que diferían en el color de sus paredes (blanco/negro) y en la textura del suelo (liso/rugoso), separados por un área central. El procedimiento, no sesgado ("unbiased") y contrabalanceado en términos de la preferencia inicial y del procedimiento de administración de los fármacos, constaba de tres fases. En la primera fase, llamada de pre-condicionamiento (Pre-C), los animales tenían libre acceso a los compartimentos durante 15 minutos (900 segundos) realizándose en dos días consecutivos. El tercer día, se realizó la misma prueba que los días anteriores pero en este caso se registró el tiempo transcurrido por los animales en cada uno de los compartimentos. Los animales que mostraron una fuerte aversión (menos de 300 s) o preferencia (más de 600 s) por alguno de los compartimentos fueron descartados del experimento. Una vez establecidos los grupos, según el tratamiento, la mitad de los animales en cada uno de los grupos recibían el fármaco o suero fisiológico en cada compartimento. Después de la asignación de compartimentos, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que permanecían en el lugar apareado con el fármaco o con el vehículo en la fase de Pre-C. Este es un paso importante en el procedimiento experimental que evita cualquier preferencia antes de iniciar el condicionamiento.

En la segunda fase (condicionamiento), cuya duración es de cuatro días, los animales recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante treinta minutos en el compartimento elegido para ser asociado con el vehículo. Tras un intervalo de cuatro horas, recibieron una inyección de cocaína, GHB o ambos fármacos antes de ser confinados en el compartimento elegido para ser asociado con la droga.

Durante la tercera fase, llamada Post-condicionamiento (Post-C o test), se registraba el tiempo que el animal, libre de cualquier tratamiento (excepto en el experimento 3), pasaba en cada compartimento durante 900 segundos.

La diferencia, en segundos, entre el tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la droga entre el día de Pre-C y del Post-C es una medida del grado de preferencia inducido por la cocaína. Si no existen diferencias, indicaría que el GHB ha bloqueado el CPL inducido por la cocaína, mientras que lo opuesto indicaría que este fármaco no ha sido capaz de bloquear esta preferencia.

Tras la prueba de Post-C realizada el octavo día, los animales realizaron sesiones de 15 minutos de extinción semanal, que consistieron en colocar a los animales en el aparato hasta que el tiempo pasado en el compartimento apareado con la droga para cada grupo de animales fuera similar al de la fase de pre-condicionamiento. Esta medición fue repetida 48 horas después con el fin de confirmar la extinción.

Dos días después de esta confirmación, se evaluaron los efectos de dosis "priming" de la droga correspondiente. La prueba de recaída fue igual que la sesión de post-condicionamiento, a excepción de que los animales realizaron el test tras la administración de la correspondiente inyección de droga o de salino. Todas las inyecciones se administraron 15 minutos antes de la prueba de restauración en el estabulario, siendo un lugar no contingente a la inyección empleada anteriormente en el condicionamiento.

Se realizó un primer experimento para establecer la curva dosis-respuesta en el CPL inducido por la cocaína (0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 mg/kg) y su reinstauración mediante inyecciones "priming" de cocaína, utilizando la mitad de la dosis administrada en el condicionamiento.

Además, se realizó un experimento adicional utilizando la dosis mayor de cocaína (50 mg/kg) durante el condicionamiento e inyectando diferentes dosis de cocaína en orden decreciente con el fin de inducir la recaída (25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/kg). En el segundo experimento, se administraron diferentes dosis de GHB (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 mg/kg) durante la fase de adquisición del CPL inducido por 50 mg/kg de cocaína. En estos grupos, la reinstauración de la preferencia fue inducida por 25 mg/kg de cocaína. El tercer experimento se realizó con el propósito de evaluar la posible potenciación de los efectos reforzantes de la cocaína al administrarla conjuntamente con dosis elevadas de GHB (50 y 100 mg/kg). Para ello se emplearon dos dosis umbral de cocaína (3 y 1.5 mg/kg) junto al GHB. En el cuarto experimento, los animales fueron condicionados con 50 mg/kg de cocaína y recibieron una dosis de GHB 30 minutos antes del test (grupos de expresión), para determinar si este fármaco era capaz de bloquear la expresión de la preferencia inducida por la cocaína. Al igual que en el segundo experimento, la reinstauración de la preferencia fue inducida por 25 mg/kg de cocaína. En el quinto experimento, los animales fueron condicionados con 50 mg/kg de cocaína, y tras la extinción de la preferencia, se les inyectó una dosis de 25 mg/kg de cocaína, sola o junto a diferentes dosis de GHB. El posible potencial del GHB para inducir la recaída por sí mismo, se evaluó en grupos adicionales que recibieron diferentes dosis de GHB en el test de recaída.

Por último, se realizó un séptimo experimento para determinar si la dosis más alta de GHB podría contrarrestar la hiperactividad inducida por la cocaína. Los animales fueron colocados en cajas de actividad inmediatamente después de recibir una sola dosis de 50 mg/kg de cocaína, 100 mg/kg de GHB, cocaína más GHB o suero fisiológico.

Los resultados obtenidos en el primer experimento nos mostraron que los grupos que recibieron cocaína (con una dosis igual o superior a 3.1

mg/kg) mostraron preferencia por el compartimento apareado con la droga. Todos los animales que mostraron preferencia, realizaron una prueba semanal y la extinción se observó a las cuatro semanas en los grupos que recibieron 50 y 3.1 mg/kg, a las tres semanas en el grupo 25 mg/kg, a las dos semanas para el grupo 12.5 mg/kg y a la semana para el grupo 6.2 mg/kg. Solamente en los grupos condicionados con 50 y 25 mg/kg de cocaína se reinstauró la preferencia. Tras una nueva extinción en estos dos grupos no se restableció de nuevo la preferencia utilizando la mitad de la dosis empleada en la primera prueba de recaída.

Los resultados obtenidos en los grupos condicionados con 50 mg/kg de cocaína que recibieron diferentes dosis de la droga con el fin de restablecer la preferencia, revelaron que solamente el grupo que recibió la dosis de 25 mg/kg de cocaína en el test de recaída mostró un incremento del tiempo en el compartimento apareado con la droga en comparación con el Pre-C y las sesiones de extinción.

En el segundo experimento, donde evaluamos el efecto del GHB sobre la adquisición del CPL inducido por la cocaína, sólo los animales que recibieron 50, 25 y 6 mg/kg de GHB mostraron preferencia. En estos grupos, el tiempo que los animales pasan en el compartimento asociado con la droga es mayor durante las fases de Post-C y de recaída que durante las fases de Pre-C y de extinción.

En el tercer experimento, donde evaluamos el efecto del GHB en la adquisición del CPL inducido por dosis umbral de cocaína, aunque en conjunto todos los grupos incrementaron el tiempo pasado en el compartimento asociado con la cocaína en el test, es el grupo que recibió 3 mg/kg el que muestra un incremento significativo.

En el cuarto experimento, los resultados nos indicaron que ninguna de las dosis de GHB administradas en el día del Post-C, afectó la expresión del CPL inducido cocaína.

En el quinto experimento, estudiamos el efecto del GHB en la reinstauración del CPL inducido por 25 mg/kg de cocaína. El restablecimiento de la preferencia se produjo sólo en los grupos que recibieron una inyección, no contingente, de cocaína sola o junto con 100, 50, 12.5 y 6.2 mg/kg de GHB. En todos estos grupos, el tiempo que los animales pasan en el compartimento asociado con la droga es mayor durante la sesión de reinstauración que en las sesiones de Pre-C y extinción.

En el sexto experimento, valoramos el efecto del GHB (100 mg/kg) sobre la actividad motora inducida por cocaína (50 mg/kg) y observamos que los animales que recibieron una inyección de cocaína sola o junto con GHB mostraron una actividad mayor que el grupo control o el que recibió únicamente GHB.

Tanto el GHB como la cocaína estimulan la neurotransmisión dopaminérgica aumentando la concentración extracelular de DA estriatal. Ya que ambas drogas son consumidas como sustancias de abuso, el presente estudio pretende evaluar el posible efecto del GHB sobre los efectos reforzantes de la cocaína utilizando para ello el procedimiento de CPL. Asimismo también estudiamos la capacidad de las inyecciones “priming” de estas drogas en la reinstauración de la preferencia. Por lo que sabemos, éste es el primer estudio en el que se valoran las consecuencias de la administración de GHB, no solamente sobre los efectos reforzantes de la cocaína, sino también sobre la conducta de búsqueda de esta droga, utilizando el procedimiento del CPL. Nuestros resultados muestran que el CPL inducido por cocaína, una vez extinguido se puede restablecer tras la

administración no contingente de una dosis “priming” de cocaína. El GHB afecta a las acciones reforzantes de la cocaína dependiendo del proceso estudiado. Cuando se administra durante la fase de adquisición, el GHB es capaz de bloquear el CPL inducido por la cocaína, pero solamente con dosis puntuales. Por otra parte, no se aprecian efectos evidentes cuando el GHB se administra durante la fase de expresión. Por otro lado, el GHB no pudo reinstaurar la preferencia una vez extinguida y solamente con una dosis intermedia se consiguió bloquear la recaída inducida por la cocaína. Las dosis más altas de GHB no afectaron el CPL inducido por las dosis más bajas de cocaína.

Coincidiendo con investigaciones anteriores, la cocaína indujo CPL con dosis desde 3,1 hasta 50 mg/kg, no afectado este hecho a la magnitud de la preferencia, ya que no se observaron diferencias significativas entre las diferentes dosis. Una vez condicionados, los animales realizaron un procedimiento de extinción semanal, que consistía en la exposición al aparato durante 15 minutos en una situación libre de droga. Este procedimiento recrea una situación real en la cual los individuos adictos paran de consumir la droga voluntariamente, pero continúan expuestos a los mismos estímulos que se han asociado a su consumo. Una vez alcanzada la extinción, el restablecimiento de la preferencia se produjo administrando una dosis de cocaína equivalente a la mitad de la utilizada para inducir la preferencia. Solo los grupos condicionados con 50 y 25 mg/kg de cocaína reinstauraron la preferencia tras recibir 25 y 12.5 mg/kg de cocaína, respectivamente. No se observó restablecimiento de la preferencia con dosis inferiores. Por otra parte, el grupo condicionado con la dosis mayor de cocaína no consiguió restablecer la preferencia con dosis iguales o inferiores a 12.5 mg/kg.

Nuestros resultados demuestran que el CPL inducido por cocaína, una vez extinguido, se puede reinstaurar tras la administración no

contingente de una dosis de cocaína. Cuando el GHB se administra en la fase de adquisición es capaz de bloquear el CPL inducido por la cocaína, pero solo con la dosis de 12.5 mg/kg y la más alta de 100 mg/kg. Este efecto de bloqueo también se ha observado en otro estudio, en el cual un tratamiento con GHB disminuía la autoadministración de cocaína. Los autores de este estudio sugieren una acción sinérgica del GHB sobre las propiedades reforzantes de la cocaína o, alternativamente, una disminución del deseo de autoadministración. Hemos de señalar que las diferencias entre ambos estudios son considerables. Además de la utilización de paradigmas diferentes (el de la autoadministración), las dosis de GHB fueron mucho más altas que las administradas en nuestro estudio, y finalmente, la especie animal utilizada fue la rata. Todas estas diferencias podrían explicar porque en nuestro estudio no se observó una disminución dosis dependiente de la preferencia de lugar inducida por la cocaína.

La mayoría de los efectos conductuales y reforzantes de las drogas psicoestimulantes se relaciona con las alteraciones que estas producen en la transmisión DA. El GHB es capaz de interferir con los sistemas cerebrales responsables de las propiedades del refuerzo de la cocaína, ya que sus receptores de alta afinidad están presentes en estructuras DA. Algunos autores sugieren que después de una disminución inicial de la liberación de DA, en una segunda fase se produciría un aumento en la liberación de DA en el estriado y en las estructuras corticolímbicas. Por lo tanto, dependiendo de la dosis utilizada, el GHB podría inducir una activación o una disminución de la neurotransmisión de DA. Si las dosis son suficientemente altas, el GHB podría inducir una rápida activación del sistema DA, imitando las características reforzantes de las drogas adictivas. Adicionalmente, el GHB reduce la liberación de glutamato en el núcleo Accumbens induciendo una excitación en las neuronas del área tegmental ventral. Durante la fase de adquisición del CPL ambas drogas fueron administradas conjuntamente,

pero dosis más alta de GHB podría inducir una estimulación DA que se retrase o prolongue más allá de la inducida por la cocaína.

Hemos de tener en cuenta que estas drogas presentan acciones diferentes sobre la DA extracelular, siendo la cocaína un bloqueador de la recaptación de DA y el GHB un liberador de DA. Estudios mediante microdiálisis han demostrado que el aumento en la liberación de DA en el estriado es más prolongado tras la administración de GHB que después de inyectar cocaína. El aumento de mRNA para los receptores D1 y D2 DA aparece igualmente retrasado tras administrar GHB en comparación con lo que ocurre después de administrar cocaína. Por tanto, se podría esperar un efecto aditivo sobre la neurotransmisión DA al administrar cocaína junto a las dosis más altas de GHB. Para probar esta hipótesis, dos dosis de GHB (50 y 100 mg/kg) fueron administradas durante la fase de la adquisición del condicionamiento junto con dosis umbral de cocaína (3 y 1,5 mg/kg). Aunque en total todos los grupos incrementaron el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a las drogas, este aumento no alcanzó la significación estadística, excepto en el grupo que recibió únicamente 3 mg/kg de cocaína.

Por lo tanto, las dosis mayores de GHB no bloquean el efecto reforzante de las dosis más bajas de cocaína, aunque tampoco lo potencian. Sin embargo, cuando se administra junto con una dosis alta de cocaína, el GHB si es capaz de bloquear este efecto. Este interesante resultado podría explicarse por una reducción de la hiperactividad inducida por la cocaína. Para comprobar esta posibilidad, la dosis más alta de GHB fue administrada junto a 50 mg/kg de cocaína y la actividad motora se evaluó durante 6 horas. El GHB no fue capaz de contrarrestar la hiperactividad inducida por la cocaína, o expresado de otra forma, 50 mg/kg de cocaína revirtieron los efectos depresores de 100 mg/kg de GHB. Este resultado nos sugiere que una disminución de la locomoción no parece ser

la causa de la falta de CPL cuando se administra la dosis más alta de GHB. Otra posible explicación, es que esta dosis induzca un amplio perfil de bloqueo de receptores, afectando no solamente a los de alta afinidad del GHB sino también a otros receptores tales como el GABA_B. El baclofen, antagonista del receptor GABA_B, reduce la liberación de DA inducida por la cocaína en el núcleo accumbens, atenuando igualmente los efectos reforzantes de esta droga.

La activación retrasada de la neurotransmisión DA producida por el GHB también podría afectar al procedimiento de condicionamiento, ya que el animal experimentaría un efecto reforzante más largo que los que reciben únicamente cocaína. Tras la administración de ambas drogas, los animales experimentan un rápido y corto efecto reforzante debido a la cocaína mientras están en el compartimento asociado con la droga, y un refuerzo tardío y más largo debido a la acción del GHB que se experimenta cuando ya han vuelto a sus jaulas. Las dosis intermedias de GHB al inducir una activación menor de DA afectarían en menor medida al condicionamiento. El hecho de que la dosis de 12,5 mg/kg también bloquee la preferencia podría ser debido a diversas causas, entre ellas un diferente porcentaje en la ocupación de los receptores de alta o baja afinidad o a que su influencia en la neurotransmisión de DA fuera diferente de la producida por dosis más altas. Los estudios de microdiálisis apuntan a que el GHB produce sus efectos centrales gracias a una disminución en la liberación de DA, que sería secundaria a sus efectos inhibitorios sobre la tasa de descarga de la neuronas DA. La disminución de la liberación de DA concuerda con los efectos comportamentales observados tras administrar GHB, muy similares a los observados con las sustancias que inhiben esta liberación. Un antagonismo mixto de los receptores D1 y D2 DA podría bloquear la expresión de la preferencia de la cocaína, y por los mismos mecanismos el GHB podría inducir un bloqueo de esta preferencia.

Por otra parte, el GHB no afectó la expresión de la preferencia por el compartimento asociado con la cocaína. Ya que la prueba de CPL se realiza un día después de la última sesión de condicionamiento en animales libres de droga, la expresión del condicionamiento depende de los procesos de memoria, incluyendo mecanismos de adquisición, consolidación y recuperación. Aunque algunos estudios han afirmado que el GHB deteriora el aprendizaje, con nuestro paradigma no hemos observado ningún déficit evidente al administrar la droga antes de la realización del test.

Independientemente de las acciones del GHB tanto en la fase de adquisición como en la de expresión de la preferencia inducida por la cocaína, los animales tratados con GHB en cualquiera de estas dos fases y que sí se condicionaron, no consiguieron reinstaurar esta preferencia después de recibir una inyección “priming” de 25 mg/kg de cocaína, como si se observa en los animales control. Aunque el GHB no haya afectado la adquisición o la expresión del CPL en estos grupos, los procesos neurobiológicos subyacentes a la reinstauración tras una inyección “priming” están afectados en estos animales, alterando el fenómeno de recaída.

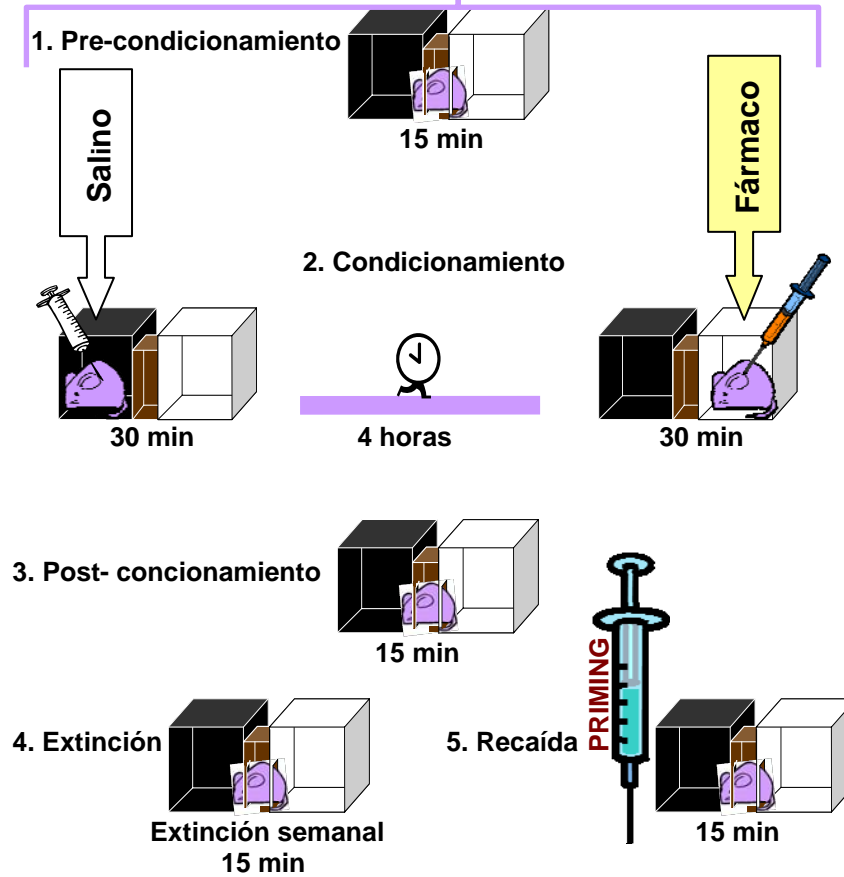
En animales condicionados con normalidad a la cocaína, una vez alcanzada la extinción, el GHB bloqueó el restablecimiento inducido por una dosis “priming” de cocaína y ninguna de las dosis utilizadas consiguió reinstaurar esta preferencia por sí misma. Una vez más, el GHB afecta los procesos de recompensa de la cocaína sólo en una estrecha franja de dosis (25 mg/kg). Utilizando esta misma cepa de ratones, ya habíamos observado que la expresión de la aversión inducida en animales dependientes a la morfina tras la administración de naloxona era bloqueada por una amplia gama de dosis de GHB, con excepción de la dosis de 25 mg/kg, que, por otra parte, fue la única capaz por sí misma, de inducir aversión en animales dependiente a la morfina. Por lo tanto, con esta dosis de GHB parece producirse un equilibrio específico con respecto a la ocupación del receptor

de GHB y/o a la activación de la neurotransmisión DA. Como ya mencionamos anteriormente, la dosis “priming” recuerdan al animal las características hedonistas de la droga y la significación de las señales asociadas previamente con la droga. El GHB podría bloquear este proceso, alterando probablemente la percepción subjetiva del efecto reforzante de la cocaína. Los animales, en estas circunstancias, no la reconocerían como la droga utilizada en el condicionamiento. Aunque las dosis más altas no fueron eficaces, y esto sugeriría una inherente capacidad para activar la recaída por sí mismas, ninguna de las dosis de GHB empleadas en este estudio consiguió reinstaurar la preferencia por el compartimento asociado con la cocaína.

En conclusión, el GHB no potencia los efectos reforzantes de la cocaína, evaluados mediante el paradigma del CPL, ya que o no es eficaz, o incluso disminuye la preferencia, dependiendo del proceso estudiado. En general, las dosis más altas de GHB no producen un efecto más fuerte, siendo el estrecho margen de efectividad un problema importante al considerar a esta droga como una posible herramienta para el tratamiento de los adictos a la cocaína. Los resultados más prometedores obtenidos en este estudio hacen referencia al hecho de que la recaída en el CPL a la cocaína se podría bloquear por acción del GHB cuando se administre durante la adquisición o la expresión del condicionamiento, o incluso junto con una dosis “priming” de cocaína. Los resultados presentados confirman que el GHB podría alterar los efectos reforzantes de la cocaína y el comportamiento de búsqueda de la misma y este hecho debería ser tenido en consideración a la hora de tratar a consumidores de cocaína, que habitualmente también consumen otras sustancias adictivas.

PROTOCOLO DE ADMINISTRACION

CPL



Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice

Concepción Maldonado, Marta Rodríguez-Arias, Ana Castillo, María A. Aguilar and José Miñarro

Cocaine addicts very often use different combinations of cocaine and other drugs of abuse such as γ -hydroxybutyric acid. The objective of the present work was to evaluate the impact of γ -hydroxybutyric acid administration on the rewarding actions of cocaine, using the conditioned place preference procedure. Cocaine-induced conditioned place preference (50 mg/kg) was studied after pairing this drug with different γ -hydroxybutyric acid doses (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/kg) during either the acquisition or the expression phase of the procedure. After conditioned place preference had been established, and the preference was extinguished, a reinstatement was induced by a dose of cocaine half of that used to produce conditioning, or by γ -hydroxybutyric acid alone or by both drugs together. The doses of 12.5 and 100 mg/kg of γ -hydroxybutyric acid blocked the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference, and no dose affected the expression of this conditioning. Reinstatement was abolished only with the dose of 25 mg/kg γ -hydroxybutyric acid, which did not reinstate the preference by itself. This is the first study evaluating the effects of γ -hydroxybutyric acid on the rewarding properties of cocaine using the conditioned

place preference procedure. The principal conclusion of the study is that γ -hydroxybutyric acid does not enhance the rewarding effect of cocaine, and within a narrow margin of effective doses, blocks the acquisition and reinstatement of cocaine-induced preference. *Behavioural Pharmacology* 17:119–131 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.

Behavioural Pharmacology 2006, 17:119–131

Keywords: cocaine, conditioned place preference, γ -hydroxybutyric acid, mouse, reinstatement

Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, University of Valencia, Avda Blasco Ibáñez 21, 46010 Valencia, Spain

Correspondence and requests for reprints to José Miñarro, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Avda Blasco Ibáñez 21, 46010 Valencia, Spain
E-mail: jose.minarro@uv.es

Sponsorship: This research was supported by the following grants: Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Investigación and FEDER (Ref BSO2002-00106); Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud 'Carlos III' (FIS), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (G03/005), Spain.

Received 19 September 2005 Accepted as revised 4 January 2006

Introduction

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) belongs to the class of substances referred to as 'club drugs', being abused for its euphoric, sedative and anabolic effects (Nicholson and Balster, 2001). GHB is a metabolite of γ -aminobutyric acid (GABA), and thus is a naturally occurring substance in the brain (Maitre, 1997). Numerous observations suggest that GHB may interfere with the brain systems responsible for the expression of the acute reinforcing properties of drugs of abuse and for the expression of the neuroadaptive changes of the dependence process (Fattore *et al.*, 2000). As a drug of abuse, it is thought that GHB enhances dopamine (DA) transmission, although there is no agreement with respect to this. An activation of the DA system by this compound has been documented in several reports (Cheramy *et al.*, 1977; Broughton and Mamelak, 1979; Diana *et al.*, 1991; Hechler *et al.*, 1991), but opposite results have also been found (Howard and Feigenbaum, 1997). In a recent study (Pistis *et al.*, 2005), GHB produced a slightly excitatory

effect in Ventral Tegmental Area (VTA) DA neurons. Two populations of neurons could be identified, those that were inhibited by GHB and those that were stimulated. The same authors claimed that GHB affected neuronal functions in the reward system by an action on GABA-B receptors.

Cocaine dependence is a common and serious condition, associated with severe medical, psychological and social problems. In reality, cocaine addicts are very often poly-drug users who consume different combinations of cocaine and other drugs of abuse (van den Brink and van Ree, 2003). The population using cocaine and GHB has risen significantly since 1999 (Bellis *et al.*, 2003). All these drugs share common neurophysiological actions on DA neurons, enhancing DA release in terminal regions of DA neurons, especially in the shell division of the nucleus accumbens (Di Chiara and Imperato, 1988; Di Chiara, 2002). Thus, GHB and cocaine share the ability to stimulate DA neurotransmission by enhancing striatal

extracellular DA concentration, and consequently, both compounds can be abused in humans and could share mechanisms involved in their prolonged use.

In the last two decades, a great number of compounds belonging to different pharmacological classes have been tested for their effectiveness in the prevention of relapse and the promotion of stable abstinence in cocaine addicts (van den Brink and van Ree, 2003). Among them, DA-acting drugs, opioids, calcium channel blockers or various antidepressants can be mentioned. Moreover, enhancing levels of GABA in the synaptic cleft is thought to reduce psychostimulant-induced increases in DA in the nucleus accumbens, thereby reducing its reinforcing properties. Gabapentin, which increases the release of GABA, significantly reduces the amount and frequency of cocaine craving in cocaine-dependent patients (Raby and Coomaraswamy, 2004). Despite numerous controlled studies, to date, however, there are no conclusive data supporting the efficacy of any pharmacological compound for prevention of relapse to cocaine (Kreek *et al.*, 2002; Shoptaw *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2003). Recently, a role for GHB in drug dependence was hypothesized on the basis of clinical studies, as it can reduce craving (Gallimberti *et al.*, 1992) and malaise during withdrawal from alcohol (Gallimberti *et al.*, 1989, 2000; Addolorato *et al.*, 1998) and from opiates (Gallimberti *et al.*, 1993, 1994, 2000) when given orally to dependent individuals. Until now, no studies have been performed with cocaine addicts.

The principal aim of the present work was to evaluate the impact of GHB administration on the rewarding actions of cocaine. As both drugs act in a similar manner on DA neurotransmission, an additive effect could be obtained. On the other hand, as GHB has been proved to be effective as a therapeutic tool to improve craving and withdrawal from alcohol and opiates, it could decrease the restoration of cocaine seeking. To test this hypothesis, the place conditioning procedure, which has been extensively used to assess the rewarding properties of cocaine, has been used. The ability of drug-associated cues to induce craving and relapse into drug-seeking behaviours is one of the potential mechanisms by which addiction endures. The conditioned place preference (CPP) procedure is an animal model of such cue-eliciting conditioning that can be used to study drug-seeking behaviours (Tzschentke, 1998). With this procedure, the rewarding or incentive properties of drugs are assessed in drug-free animals by the amount of time spent in an environment previously paired with the drug effects. This test may represent a useful tool to evaluate individual sensitivity to the incentive properties of addictive drugs. Drugs with abuse liability in humans reliably produce CPP in rodents (Tzschentke, 1998), with cocaine inducing a well documented CPP in mice (Seale and Carney, 1991; Cunningham *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002; Brabant *et al.*, 2005).

In recent years, the place conditioning procedure has been increasingly used to study the relapse into drug-seeking behaviours, morphine (Ribeiro Do Couto *et al.*, 2005) and cocaine (Mueller and Stewart, 2000; Szumlinski *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2003) being the most studied drugs. After the establishment of a reliable CPP for the drug-paired compartment, this preference is gradually extinguished by repeated exposure of the animals to the drug-paired compartment in a drug-free state. At the end of the extinction procedure, different factors such as priming drug injections or acute stress may be tested to investigate whether they are able to reinstate a significant CPP (Brabant *et al.*, 2005). Cocaine-induced CPP was studied after pairing this drug with different GHB doses during either the acquisition or the expression phase of the procedure. Once CPP was established, the preference was extinguished after repeated test trials in which the animals were exposed to both compartments in a drug-free state. At the end of the extinction procedure, a reinstatement of the preference was induced by a dose of cocaine half of that used to produce conditioning (Itzhak and Martin, 2002; Szumlinski *et al.*, 2002) by GHB alone or by both drugs together.

Methods

Subjects

In this first study, 407 albino male mice of the OF1 strain, acquired commercially from Charles River (Barcelona, Spain), were used. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of four in transparent plastic cages (22 × 38 cm) for an adaptation time of 10 days, under the following conditions: constant temperature (21 ± 2°C), a reversed light schedule (white lights on 19.30–07.30 h), and food and water freely available, except during the behavioural test. Procedures involving mice and their care conformed to national, regional and local laws and regulations, and were in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

Apparatus

In the CPP experiments, four identical Plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm long × 31.5 cm wide × 34.5 cm high) separated by a grey central area (13.8 cm long × 31.5 cm wide × 34.5 cm high) were used. The compartments had different coloured walls (black vs. white) and also distinct floor textures (fine grid in the white compartment and wide grid in the black one). The floor in the central area was smooth and a little elevated with respect to the floors of the other compartments (3.5 mm), with doors (14 cm height × 8.5 cm width) that allowed the animal to pass through. Four infrared light beams at the entrance of each compartment of the box and six in the central area allowed the recording of the animal's position and its crossing from one compartment to the other. When the animal interrupted the first beam at the entrance of one compartment and no beam was

interrupted in the central area, the apparatus registered it as an entry, the location of the mouse always being known. The equipment was controlled by an IBM PC computer using MONPRE 2Z software (CIBERTEC SA, Madrid, Spain).

For the measurement of motor activity, an actimeter with four sensory plates 35 × 35 cm (pb 46 603), an interface (pb 40 035) and a computer (Olivetti PCS 286) with the DAS 16 programme (v. 1.0.) were used. The four sensory plates registered the activity of the animals for 6 h by means of an electromagnetic system, and the DAS programme allowed the acquisition and storage of the data from the sensory plates.

Procedure

Acquisition and expression of the place preference

The experiment, consisting of three phases, was carried out following an unbiased procedure. During the first phase (preconditioning), mice were given free access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) each day for 2 days. On day 3, the time spent by the animal in each compartment was recorded for 900 s. Animals showing a strong unconditioned aversion or preference (less than 33% or more than 66% of the session time, i.e. 300 and 600 s, respectively) for any compartment were discarded. In each treatment group, half of the animals received the drug or vehicle in each compartment. After assigning the compartments, there

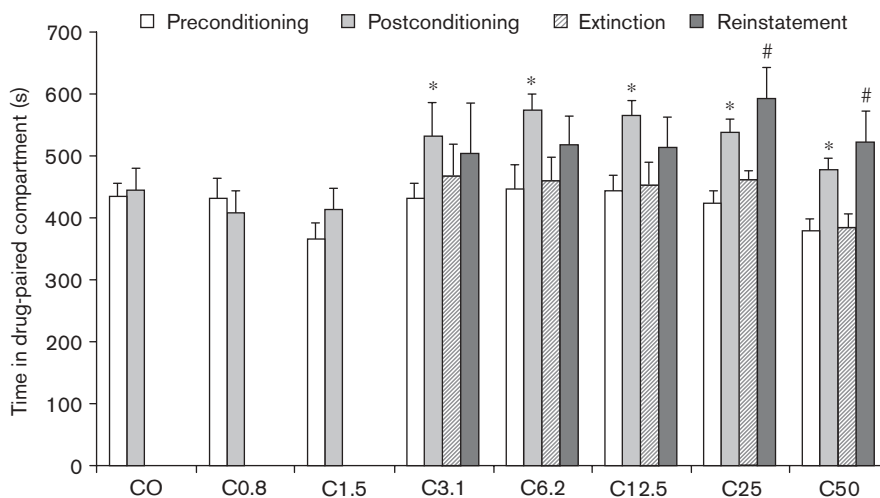
were no significant differences between the time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments during the preconditioning phase. This is an important step in the experimental procedure that avoids any preference bias before conditioning.

In the second phase (conditioning), which had a duration of 4 days, animals received an injection of physiological saline immediately before being confined in the vehicle-paired compartment for 30 min. After an interval of 4 h, they received an injection of cocaine, GHB or both, immediately before confinement in the drug-paired compartment for 30 min. Confinement was carried out in both cases by closing the guillotine door that separates the two compartments.

During the third phase (postconditioning), on day 8, the guillotine door separating the two compartments was removed and the time spent by the untreated mice (except in experiment 3) in each compartment was recorded for 900 s.

The difference, in seconds, between the time spent in the drug-paired compartment in the postconditioning test and that spent in the preconditioning phase is taken as a measure of the degree of reward induced by cocaine. If there is no difference, it indicates that GHB has blocked cocaine-induced CPP, whereas the opposite that indicates the drug does not block this reward.

Fig. 1



Effects of different doses of cocaine on the acquisition of conditioned place preference. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square), after conditioning sessions (\blacksquare), in the last extinction sessions (dashed lines) and in the reinstatement test (dark grey). During conditioning, animals were divided into the following treatment groups: C0, physiological saline ($n=10$); C0.8, cocaine 0.78 mg/kg ($n=10$); C1.5, cocaine 1.562 mg/kg ($n=9$); C3.1, cocaine 3.125 mg/kg ($n=10$); C6.2, cocaine 6.25 mg/kg ($n=10$); C12.5, cocaine 12.5 mg/kg ($n=10$); C25, cocaine 25 mg/kg ($n=14$) and C50, cocaine 50 mg/kg ($n=15$). Animals conditioned with the corresponding cocaine dose underwent an extinction procedure and were then tested 15 min after receiving half of the cocaine dose used for conditioning. Paired Student's *t*-test * $P < 0.01$ significant difference in time spent in Post-C vs. Pre-C; # $P < 0.01$ significant difference in time spent in the reinstatement vs. Pre-C and extinction sessions.

Extinction of the place preference

After the postconditioning test on day 8, the animals underwent 15-min weekly extinction sessions, which consisted of the placement of the animals in the apparatus (without guillotine doors separating the compartments), until the time spent in the drug-paired compartment for each group of animals was similar to that of the preconditioning session. This measure was repeated 48 h later in order to confirm the extinction.

Reinstatement of the place preference

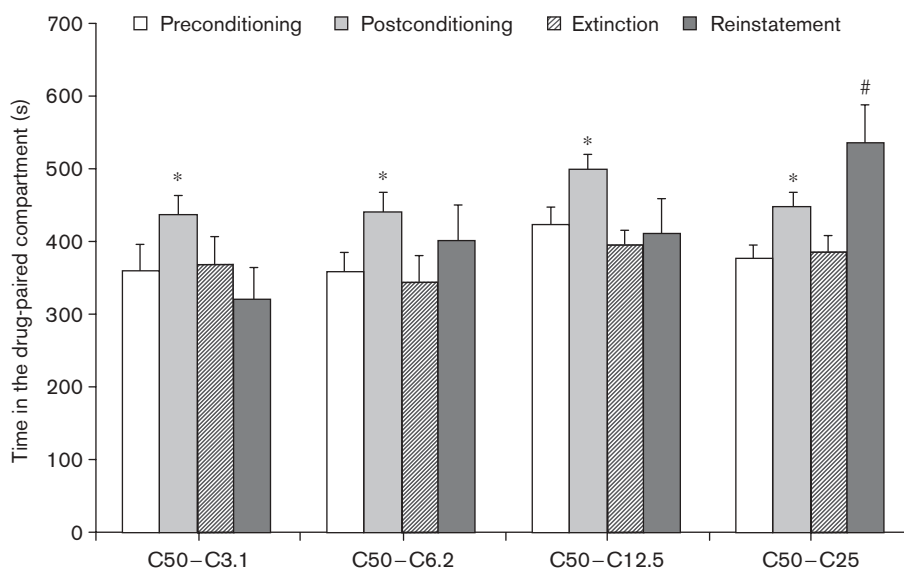
Two days after the extinction was confirmed, the effects of priming doses of the corresponding drug were evaluated. The tests of reinstatement were the same as for the postconditioning (free ambulation for 15 min) session, except that the animals were tested after the administration of the respective drug or saline injection. All the priming injections were given 15 min before the reinstatement tests in the colony room, a noncontingent place to the previous conditioning injection.

Drug treatments

A first experiment was carried out to perform a dose-response cocaine-induced CPP (0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg) and reinstatement with priming injections of cocaine, using half of the dose administered in the conditioning. An additional experiment was performed using the high dose of cocaine (50 mg/kg) for the conditioning procedure and decreasing cocaine doses

for the priming injection (25, 12.5, 6.25 and 3.125 mg/kg), the animals being divided into the following groups: C50-C25, C50-C12.5, C50-C6.25 and C50-C3.1. In a second experiment, different doses of GHB (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/kg) were administered during the acquisition phase of CPP induced by 50 mg/kg of cocaine, the animals being divided into five groups: Acq-C50GHB100, Acq-C50GHB50, Acq-C50GHB25, Acq-C50GHB12.5 and Acq-C50GHB6.25. In these groups, reinstatement of the preference was induced by 25 mg/kg of cocaine. A third experiment was carried out with two borderline doses of cocaine (3 and 1.5 mg/kg) plus the two higher GHB doses, with the aim of evaluating the possible GHB-induced potentiation of the rewarding effects of cocaine (Acq-C3, Acq-C3GHB100, Acq-C3GHB50, Acq-C1.5, Acq-C1.5GHB100 and Acq-C1.5GHB50). In the fourth experiment, animals were conditioned with 50 mg/kg of cocaine and received one of five GHB doses 30 min before the test session (expression groups), to determine whether this drug was able to block the expression of cocaine-induced preference (Exp-C50GHB100, Exp-C50GHB50, Exp-C50GHB25, Exp-C50GHB12.5 and Exp-C50GHB6.25). As in the second experiment, reinstatement of the preference was induced by 25 mg/kg of cocaine. In the fifth experiment, animals were conditioned with 50 mg/kg of cocaine, and after extinction of the preference, were injected with a priming dose of 25 mg/kg of cocaine, alone or with different GHB doses (R-Sal, R-C25, R-C25GHB100, R-C25GHB50, R-C25GHB25, R-C25GHB12.5 and R-

Fig. 2



Effects of different priming doses of cocaine on the reinstatement of 50 mg/kg of cocaine-induced conditioned place preference. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square), after conditioning sessions (\blacksquare), in the last extinction sessions (dashed lines) and in the reinstatement test (dark grey). After conditioning with 50 mg/kg of cocaine (C50), animals were divided into the following treatment groups depending on the priming dose of cocaine: C50-C25, 25 mg/kg ($n=8$); C50-C12.5, 12.5 mg/kg ($n=8$); C50-C6.2, 6.25 mg/kg ($n=8$) and C50-C3.1, 3.125 mg/kg ($n=8$). * $P < 0.01$ significant difference in time spent in Post-C vs. Pre-C and extinction sessions; # $P < 0.01$, significant difference in time spent in the reinstatement vs. Pre-C and extinction sessions.

C25GHB6.25). In order to test the potential of GHB to induce reinstatement by itself, additional groups received a priming administration of different doses of GHB (R-GHB100, R-GHB50, R-GHB25, R-GHB12.5 and R-GHB6.25).

Cocaine-induced motor activity

A seventh experiment was carried out to assess whether the highest GHB dose used could counteract cocaine-induced hyperactivity. Mice were placed into the activity cages immediately after a single dose of 50 mg/kg of cocaine (C50), 100 mg/kg of GHB (GHB100), cocaine plus GHB (C50 + GHB100) or physiological saline (Sal).

Drugs

GHB (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA) and cocaine (Laboratorio Alcaliber SA, Madrid, Spain) were used in these experiments. Drugs were diluted in physiological saline (NaCl 0.9%) at a constant volume (10 ml/kg) and administered intraperitoneally.

Statistical analysis

Data for the time spent in the drug-paired compartment were analysed with a mixed analysis of variance (ANOVA), with treatment as a between-subjects variable, with a different number of levels depending on the treatment groups, and days as a within-subjects variable with four

levels (Pre-C, Post-C, extinction and reinstatement). To make post-hoc comparisons, Newman-Keuls and Simple Effects tests were performed. In experiments 1 and 2, two different ANOVAs were conducted: that mentioned previously (including only the groups that achieved preference) and another including all the groups and with only two levels for the variable days (Pre-C and Post-C).

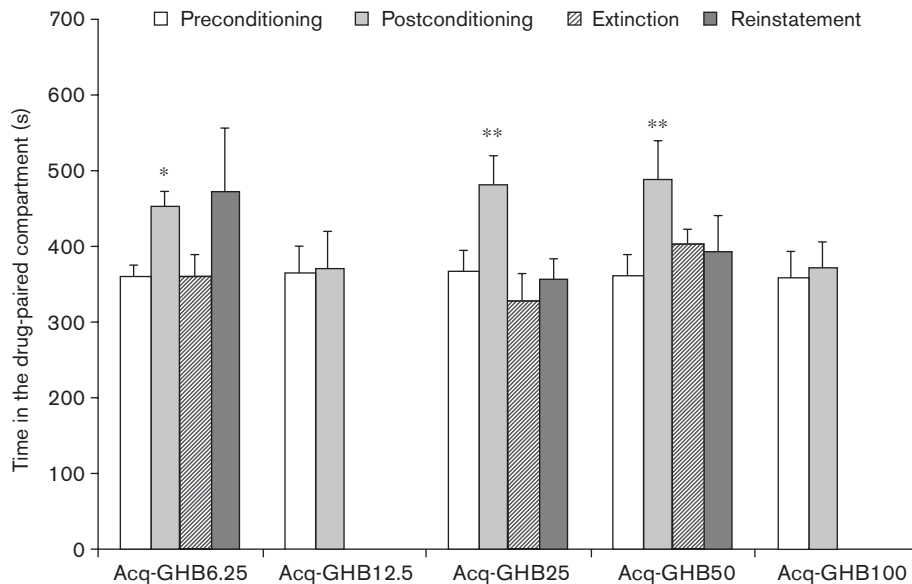
Motor activity data were analysed using an ANOVA with time of recording (hours) as a within-subjects factor and treatment with four levels (treatment groups) as a between-subjects factor.

Results

Experiment 1: Dose-response of cocaine-induced conditioned place preference and reinstatement

The results obtained in the cocaine-induced CPP are shown in Fig. 1. The ANOVA performed for all the groups revealed significant effects of treatment [$F(7,82) = 4.50$; $P < 0.001$], days [$F(1,82) = 37.39$; $P < 0.001$] and the treatment \times days interaction [$F(7,82) = 2.63$; $P < 0.02$]. A significant difference was observed between Pre-C and Post-C ($P < 0.01$), the time spent in the drug-paired compartment being higher Post-C. Newman-Keuls tests for the variable treatment showed a significant difference in the time spent in the drug-paired compartment between group C1.5 and those receiving 25, 12.5, 6.2

Fig. 3



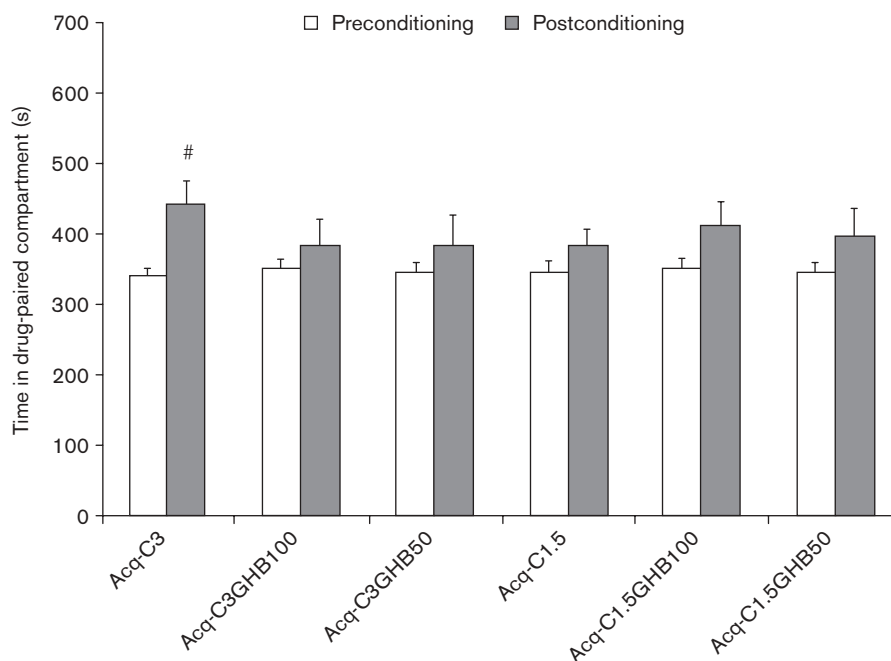
Effects of different doses of γ -hydroxybutyric acid (GHB) on the acquisition of 50 mg/kg of cocaine-induced conditioned place preference. Bars represented the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square) and after conditioning sessions (\blacksquare). During conditioning, animals were divided into the following treatment groups: Acq-C50GHB6.25, 50 mg/kg of cocaine plus 6.25 mg/kg of GHB ($n = 10$); Acq-C50GHB12.5, 50 mg/kg of cocaine plus 12.5 mg/kg of GHB ($n = 10$); Acq-C50GHB25, 50 mg/kg of cocaine plus 25 mg/kg of GHB ($n = 10$); Acq-C50GHB50, 50 mg/kg of cocaine plus 50 mg/kg of GHB ($n = 10$) and Acq-C50GHB100, 50 mg/kg of cocaine plus 100 mg/kg of GHB ($n = 10$). ** $P < 0.001$; * $P < 0.01$, significant difference in time spent in Pre-C vs. Post-C sessions.

and 3.1 mg/kg of cocaine ($P < 0.05$). These differences could be due to the postconditioning test, as post-hoc comparisons did not show differences in the preconditioning session between groups but did so for the postconditioning session, with animals receiving cocaine from 25 to 3.1 mg/kg showing higher values than those receiving lower doses ($P < 0.01$ for C12.5 and C6.2, and $P < 0.05$ for C25 and C3.1). Post-hoc comparisons demonstrated that only groups receiving 3.1 mg/kg of cocaine and more showed preference for the compartment paired with cocaine ($P < 0.01$). All animals showing preference were exposed to the apparatus every week and extinction was observed after 4 weeks for groups C50 and C3.1, after 3 weeks for group C25, 2 weeks for group C12.5 and 1 week for group C6.2. In these groups, after extinction was confirmed, the data were analysed with another ANOVA including the four sessions, which revealed a significant effect of the variable days [$F(3,162) = 15.56$; $P < 0.001$]. The variable treatment [$F(2,24) = 1.087$; NS] and the interaction [$F(12,162) = 0.63$; NS] were not significant. A Newman-Keuls test indicated a significant difference between Pre-C and extinction with respect to Post-C and reinstatement ($P < 0.01$) for the variable days, the time spent in the drug-paired compartment being higher at

Post-C and reinstatement. A paired Student's t -test between the reinstatement and Pre-C or extinction sessions revealed that a priming dose of cocaine reinstated the preference only in those animals conditioned with 50 and 25 mg/kg of cocaine ($P < 0.01$). After a new extinction in these two groups, no restoration of the preference was observed with half of the dose employed for the first reinstatement test.

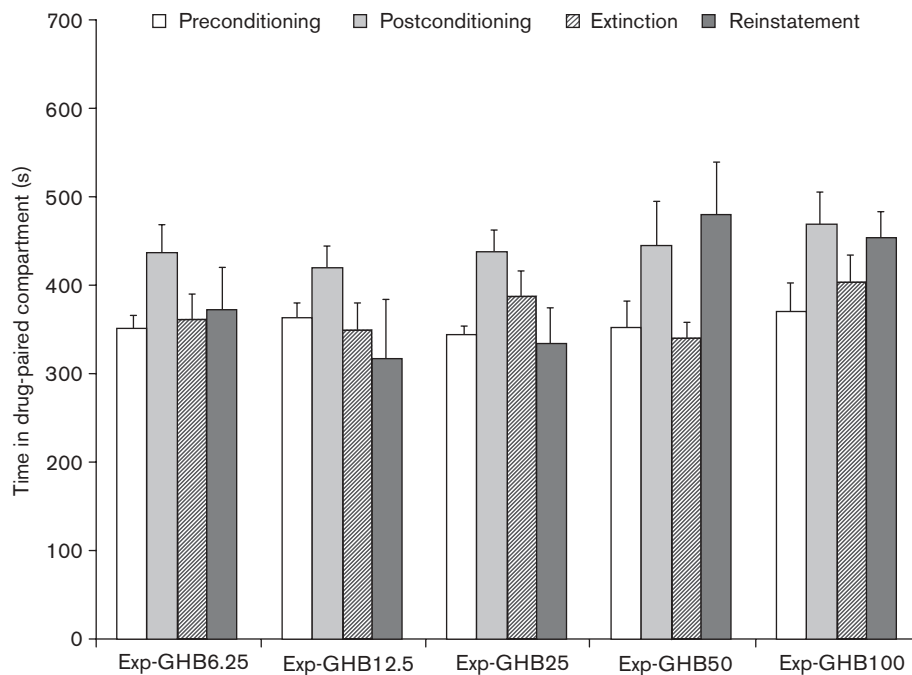
The ANOVA performed on the data obtained using 50 mg/kg for the conditioning procedure and decreasing cocaine doses for the priming injections (see Fig. 2) revealed significant effects of treatment [$F(3,28) = 5.30$; $P < 0.01$], days [$F(3,81) = 5.73$; $P < 0.002$] and the interaction [$F(9,81) = 2.25$; $P < 0.05$]. The time spent in the drug-paired compartment in group C50–C3.1 was significantly lower than in groups receiving the highest cocaine priming doses (C50–C25 and C50–C12.5) ($P < 0.05$). This difference was due to the reinstatement session, as only in this test did treatment induce an effect. Time spent in the drug-paired compartment was significantly higher in the Post-C than in the Pre-C and extinction sessions ($P < 0.01$). Only in the C50–C25 group did the reinstatement session show a significant increase with respect to the Pre-C and extinction sessions ($P < 0.01$).

Fig. 4



Effects of 50 and 100 mg/kg of γ -hydroxybutyric acid (GHB) on the acquisition of 1.5 and 3 mg/kg of cocaine-induced conditioned place preference. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square) and after conditioning sessions (\blacksquare). During conditioning, animals were divided into the following treatment groups: Acq-C3, 3 mg/kg of cocaine ($n = 10$); Acq-C3GHB50, 3 mg/kg of cocaine plus 50 mg/kg of GHB ($n = 10$); Acq-C3GHB100, 3 mg/kg of cocaine plus 100 mg/kg of GHB ($n = 10$); Acq-C1.5, 1.5 mg/kg of cocaine ($n = 10$); Acq-C1.5GHB50, 1.5 mg/kg of cocaine plus 50 mg/kg of GHB ($n = 10$) and Acq-C1.5GHB100, 1.5 mg/kg of cocaine plus 100 mg/kg of GHB ($n = 10$). Paired Student's t -test # $P < 0.01$, significant difference in time spent in Post-C vs. Pre-C.

Fig. 5



Effects of different doses of γ -hydroxybutyric acid (GHB) on the expression of conditioned place preference induced by 50 mg/kg of cocaine administered prior to the postconditioning test. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square), after conditioning sessions (\blacksquare), in the last extinction sessions (dashed lines) and in the reinstatement test (dark grey). The animals acquired the conditioning with cocaine and on the postconditioning day were divided into the following treatment groups: Exp-C50GHB6.25, 6.25 mg/kg of GHB ($n=10$); Exp-C50GHB12.5, 12.5 mg/kg of GHB ($n=10$); Exp-C50GHB25, 25 mg/kg of GHB ($n=10$); Exp-C50GHB50, 50 mg/kg of GHB ($n=9$) and Exp-C50GHB100, 100 mg/kg of GHB ($n=10$).

Experiment 2: Effect of gamma-hydroxybutyric acid on the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference

The effects of GHB on the acquisition of cocaine-induced CPP are represented in Fig. 3. The ANOVA revealed a significant effect of the variable days [$F(1,45) = 20.54$; $P < 0.001$] and the treatment \times days interaction [$F(4,45) = 2.725$; $P < 0.05$]. The effect of treatment [$F(4,45) = 1.07$; NS] was not significant. A Newman-Keuls test indicated a significant difference between Pre-C and Post-C ($P < 0.01$) for the variable days, the time spent in the drug-paired compartment being higher Post-C. Post-hoc comparisons demonstrated that only groups receiving 50, 25 ($P < 0.001$) and 6 mg/kg ($P < 0.01$) of GHB showed CPP. In these groups, after extinction was confirmed, a new ANOVA including the four sessions revealed a significant effect of the variable days [$F(3,72) = 1.81$; $P < 0.001$]. The variable treatment [$F(2,24) = 1.1$; NS] and the treatment \times days interaction [$F(6,72) = 1.81$; NS] were not significant. A Newman-Keuls test indicated that the time spent in the drug-paired compartment during the Post-C and the reinstatement sessions was higher than that during the Pre-C and extinction sessions ($P < 0.05$), but Post-C values were also higher than those in the reinstatement session ($P < 0.05$).

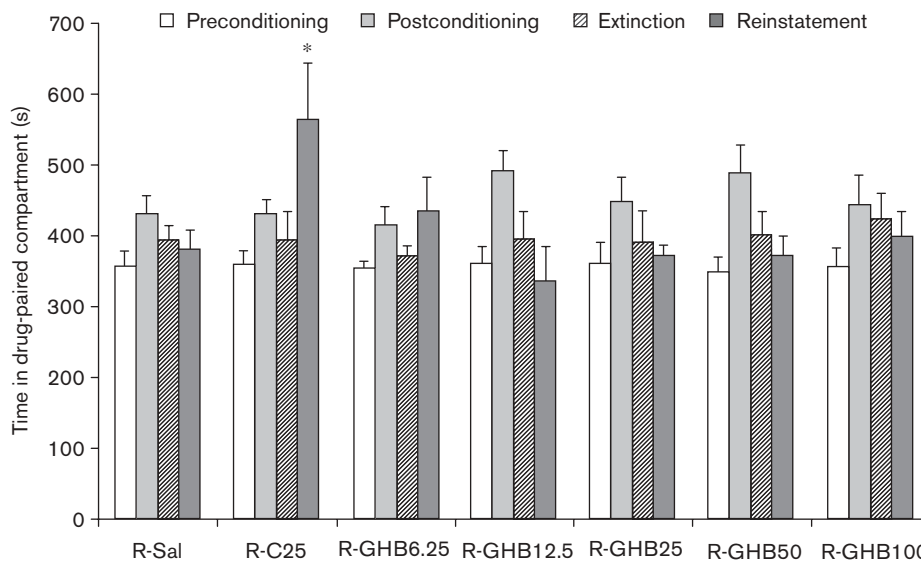
Experiment 3: Effect of gamma-hydroxybutyric acid on the acquisition of conditioned place preference induced by threshold doses of cocaine

The ANOVA of the results obtained on the effect of GHB on the acquisition of CPP induced by low doses of cocaine (see Fig. 4) revealed a significant effect of the variable days [$F(1,53) = 14.95$; $P < 0.001$]. The variable treatment [$F(5,53) = 0.290$; NS] and the treatment \times days interaction [$F(5,53) = 0.60$, NS] were nonsignificant. A Newman-Keuls test showed a significant difference between Pre-C and Post-C ($P < 0.01$), the time spent in the drug-paired compartment being higher Post-C, which suggests that all the groups acquired CPP after cocaine administration. A paired t -test between the Pre-C and Post-C data showed a significant increase only in the group Acq-C3 ($P < 0.03$).

Experiment 4: Effect of gamma-hydroxybutyric acid on the expression of cocaine-induced conditioned place preference

The ANOVA of the results obtained for the effect of GHB on the expression of cocaine-induced CPP (see Fig. 5) revealed a significant effect of the variable days [$F(3,120) = 4.71$; $P < 0.005$]. The variable treatment [$F(4,120) = 1.90$; NS] and the treatment \times days

Fig. 6



Effects of different doses of γ -hydroxybutyric acid (GHB) and 25 mg/kg of cocaine on the reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square), after conditioning sessions (\blacksquare), in the last extinction sessions (dashed lines) and in reinstatement test (dark grey). After the conditioning and extinction procedures, animals were divided into the following treatment groups: R-Sal, physiological saline ($n=10$); R-C25, cocaine 25 mg/kg ($n=10$); R-GHB6.25, 6.25 mg/kg of GHB ($n=9$); R-GHB12.5, 12.5 mg/kg of GHB ($n=10$); R-GHB25, 25 mg/kg of GHB ($n=10$); R-GHB50, 50 mg/kg of GHB ($n=10$) and R-GHB100, 100 mg/kg of GHB ($n=14$). * $P < 0.01$, significant difference in time spent in the reinstatement vs. Pre-C and extinction sessions.

interaction [$F(12,120) = 1.10$; NS] were not significant. A Newman-Keuls test showed a significant difference between the Pre-C and extinction sessions with respect to the post-conditioning test ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), the time spent in the drug-paired compartment being higher in Post-C, which indicates that all the groups acquired CPP after cocaine administration.

Experiment 5: Effect of gamma-hydroxybutyric acid on the reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference

The results obtained on the reinstatement of cocaine-induced CPP by priming injections of saline, cocaine, GHB or cocaine plus GHB are represented in Figs 6 and 7. The ANOVA revealed a significant effect of the variable days [$F(3,300) = 21.65$; $P < 0.001$] and the treatment \times days interaction [$F(33,300) = 1.60$; $P < 0.025$]. The variable treatment [$F(11,100) = 1.16$; NS] was not significant. A Newman-Keuls test showed a significant difference between the Pre-C and extinction sessions with respect to Post-C and reinstatement ($P < 0.01$), with the time spent in the drug-paired compartment being higher in Post-C and reinstatement, the latter increase mainly owing to the groups receiving cocaine in the priming injection. The administration of 25 mg/kg of cocaine reinstated the preference only in groups receiving a noncontingent injection of cocaine alone or with 100, 50, 12.5 and 6.2 mg/kg of GHB. In all these groups, time spent in the drug-paired compartment was higher during the reinstatement

session than during the Pre-C ($P < 0.05$ for R-C25GHB50 and R-C25GHB6.2, and $P < 0.01$ for the rest) and extinction sessions ($P < 0.01$ for R-C25 and $P < 0.05$ for the rest).

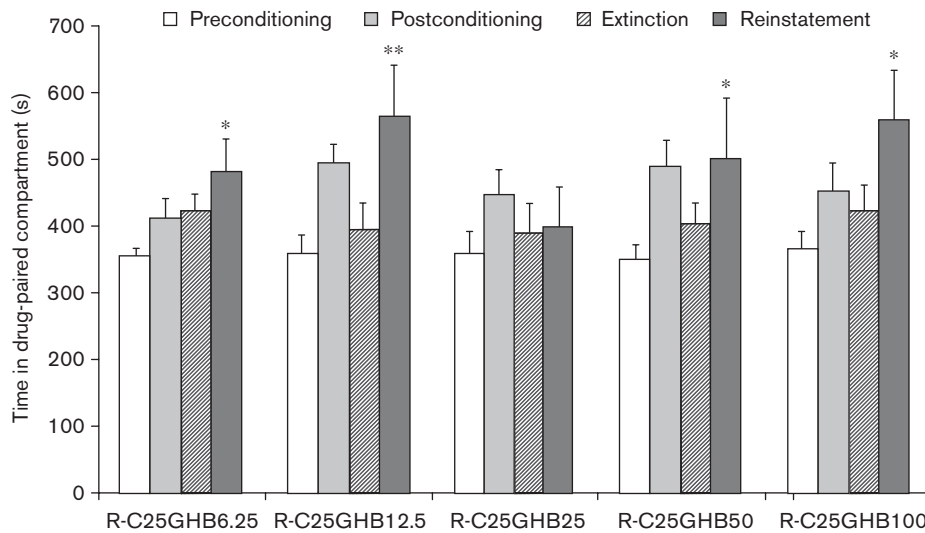
Experiment 6: Effect of gamma-hydroxybutyric acid on cocaine-induced motor activity

ANOVA of spontaneous motor activity for 6 h (see Fig. 6) revealed significant effects of treatment [$F(3,36) = 8.06$; $P < 0.001$], h [$F(5,180) = 42.69$; $P < 0.001$] and the interaction [$F(15,180) = 4.30$; $P < 0.001$]. Newman-Keuls post-hoc analysis showed that animals that received a cocaine injection, alone or with GHB showed higher activity than the other two groups ($P < 0.01$ with respect to controls in all cases, except $P < 0.05$ for C50 + GHB100 groups). ANOVA of each of the first 3 h revealed that the differences between these groups persisted throughout this period. Newman-Keuls post-hoc analysis revealed higher activity levels in each of the first 3 h than later ($P < 0.01$). These results show that the highest dose of GHB cannot block cocaine-induced hyperactivity (Fig. 8).

Discussion

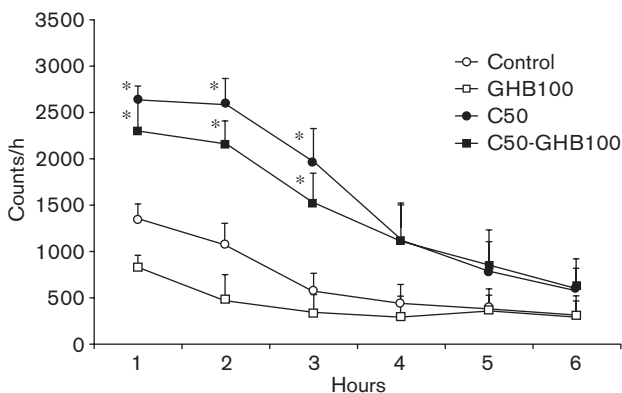
GHB and cocaine share the ability to stimulate dopaminergic neurotransmission by enhancing striatal extracellular DA concentration. As both compounds may be abused in humans, the present study examined whether GHB could affect the reinforcing effects of cocaine, evaluated through the CPP procedure, and also the ability

Fig. 7



Effects of different doses of γ -hydroxybutyric acid (GHB) and 25 mg/kg of cocaine on the reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square), after conditioning sessions (\square), in the last extinction sessions (dashed lines) and in the reinstatement test (dark grey). After the conditioning and extinction procedures, animals were divided into the following treatment groups: R-C25GHB6.25, 25 mg/kg of cocaine plus 6.25 mg/kg of GHB ($n=10$); R-C25GHB12.5, 25 mg/kg of cocaine plus 12.5 mg/kg of GHB ($n=10$); R-C25GHB25, 25 mg/kg of cocaine plus 25 mg/kg of GHB ($n=9$); R-C25GHB50, 25 mg/kg of cocaine plus 50 mg/kg of GHB ($n=10$) and R-C25GHB100, 25 mg/kg of cocaine plus 100 mg/kg of GHB ($n=10$). * $P<0.01$, significant difference in time spent in the reinstatement vs. Pre-C session. ** $P<0.05$ significant difference in time spent in the reinstatement vs. extinction session.

Fig. 8



Effects of 100 mg/kg of γ -hydroxybutyric acid (GHB) on hyperactivity induced by 50 mg/kg of cocaine. * $P<0.01$, significant difference with respect to the control group.

of priming injections of these drugs to reinstate this preference, once extinguished. To our knowledge, this is the first study to evaluate the consequences of GHB administration, not only on the rewarding action of cocaine, but also on cocaine-seeking behaviour, using the CPP procedure. Our results show that an extinguished cocaine-induced CPP could be reinstated by the non-contingent administration of a priming dose of cocaine. GHB affects the rewarding actions of cocaine depending on the process studied. When administered during the

acquisition phase, GHB is capable of blocking cocaine-induced CPP, but only with punctual doses. On the other hand, no effects are evident when GHB is administered during the expression phase (before the postconditioning test). After extinction was achieved in animals conditioned with cocaine, GHB could not reinstate this preference and only with an intermediate dose did it block cocaine-induced reinstatement. Higher doses of GHB did not affect the CPP induced by low doses of cocaine.

In accordance with previous reports (Seale and Carney, 1991; Cunningham *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002; Brabant *et al.*, 2005), cocaine induces CPP with a wide range of doses (from 3.1 to 50 mg/kg). The dose does not seem to affect the magnitude of the cocaine-induced place preference, because no differences were observed between doses, as has been previously described (Brabant *et al.*, 2005). Once conditioned, the animals underwent a weekly extinction procedure consisting of exposure to the apparatus for 15 min in a drug-free state, without experiencing its reinforcing effects. This procedure closely models a real situation in which addicted individuals voluntarily stop taking the drug but continue to be exposed to the same stimuli they have associated with drug consumption. Extinction took longer to achieve in groups conditioned with the highest (50 mg/kg) and the lowest (3.1 mg/kg) doses that induced preference, again confirming that there is no dose-dependent response in the magnitude or duration of preference. Once extinguished, reinstatement of the preference was

produced by administering a dose of cocaine which was half of that used to induce preference. Only groups conditioned with 50 and 25 mg/kg of cocaine reinstated their preference after receiving 25 and 12.5 mg/kg, respectively. No reinstatement was observed with lower priming doses. Moreover, the group conditioned with the highest cocaine dose did not reinstate the preference with 12.5 mg/kg or lower doses of cocaine. Using a similar experimental procedure, we obtained a reinstatement of morphine preference using lower priming doses (5 mg/kg) (Ribeiro Do Couto *et al.*, 2003, 2005). After extinction of cocaine-induced CPP, however, the priming dose necessary to reinstate the preference has to be half of that used for the conditioning. Similar results have been found in previous reports, with priming doses of 15 mg/kg being required when 20 or 30 mg/kg of cocaine were used for the conditioning (Itzhak and Martin, 2002; Romieu *et al.*, 2004). Nevertheless, Szumlinski and coworkers (2002) obtained reinstatement with lower doses (5 mg/kg), but using a biased place preference procedure (cocaine was paired with the nonpreferred compartment), which makes the experimental situation noncomparable. Thus, our results showed that an extinguished cocaine-induced CPP could be reinstated by the noncontingent administration of a priming dose of cocaine. Thus, the place preference procedure can be useful as a model for studying the mechanisms of drug-induced relapse to cocaine addiction in mice. In the following studies, to assess the effect of GHB, we chose the dose of 50 mg/kg to induce CPP, in order to obtain not only a strong preference but also, even more importantly, a robust reinstatement after a priming dose of 25 mg/kg. Although reinstatement was also obtained with lower doses of cocaine (25 mg/kg for conditioning and 12.5 mg/kg for reinstatement), this response was not as reliable as that obtained with the highest cocaine dose.

When administered during the acquisition phase, GHB is able to block cocaine-induced CPP, but only with certain doses, that is, only the intermediate (12.5 mg/kg) and highest (100 mg/kg) doses. This blockade by GHB is in agreement with a previous study in which pretreatment with GHB dose dependently decreased cocaine self-administration (Martellotta *et al.*, 1998). These authors suggest a synergic action of GHB on reinforcing properties of cocaine or, alternatively, a decreased desire to self-administer. Considerable differences are apparent between this and the study presented here. Martellotta and coworkers used a different paradigm, self-administration, in order to evaluate cocaine-seeking behaviour, the GHB doses were higher than those administered in our study, and, finally, the animal species used was rats. All these differences can fully explain the fact that we did not obtain a dose-dependent decrease in cocaine-induced CPP. The interpretation of the GHB effects on the acquisition of cocaine preference is complex because of the fact that the blockade effect was obtained only with

certain doses. On the one hand, the highest dose tested, 100 mg/kg, is within the well known GHB-effective dose range, but, on the other, 12.5 mg/kg appears to be in the limit of that range. Although most of the studies performed with GHB in rodents employ higher GHB doses (from 100 mg/kg upwards), we have previously observed that even with low doses the compound is effective. In morphine-dependent mice, 12.5 mg/kg of GHB was able to block the acquisition of the conditioned place aversion induced in these dependent animals after a naloxone injection, and 6 mg/kg of GHB blocked the expression of this conditioning (Maldonado *et al.*, 2004). Furthermore, we also found that GHB can exert a particular response within a narrow margin of doses. Using the same strain of mice, motivational effects on CPP were not observed after administering GHB in either naïve mice or morphine-dependent animals, except for the 25 mg/kg of GHB, which induced aversion. Most of the studies on GHB employ high doses and do not allow the appearance of this 'U' shape effect. In self-administration studies, however, GHB induced self-administration according to a bell-shaped curve with no effect at doses lower than 0.01 mg/kg per injection or higher than 0.5 mg/kg per injection (Martellotta *et al.*, 1998).

Much of the behavioural and reinforcing potential of psychostimulant drugs is related to alterations in DA transmission (Koob, 1992). GHB may interfere with the brain systems responsible for the acute reinforcing properties of cocaine, as its high-affinity receptors are present in DA structures (Hechler *et al.*, 1992). It has been reported that after an initial decrement in DA release, a second phase of GHB modulation occurs in which there is an enhanced release of DA in the striatum and corticolimbic structures (Maitre, 1997). Therefore, depending on the dose used, GHB could induce activation (Diana *et al.*, 1991) or diminution (Howard and Feigenbaum, 1997) of DA neurotransmission. According to some authors, if the doses are sufficient, GHB could induce a rapid activation of the DA system, thus mimicking the rewarding properties of addictive drugs (Diana *et al.*, 1991), which is what could occur with the highest dose. GHB induces an excitatory effect in ventral tegmental area DA neurons (Pistis *et al.*, 2005), which could be due to a reduction in glutamate release in the nucleus accumbens (Uchimura and North, 1991). During the acquisition phase, in which both drugs were administered together, the high GHB dose could induce DA stimulation that may be delayed or prolonged, as compared with cocaine-induced DA stimulation. Moreover, cocaine is a DA reuptake blocker and GHB is a DA releaser; therefore, they trigger different extracellular DA kinetics. As demonstrated by microdialysis studies, the increased striatal DA release has been shown to last longer after GHB administration (Hechler *et al.*, 1991) than after cocaine injection (Hurd and Ungerstedt,

1989). The increase in the D1 and D2 DA receptor mRNA was similarly delayed after GHB compared with cocaine (Schmidt-Mutter *et al.*, 1999). An additive effect of cocaine and higher GHB doses on DA neurotransmission can be expected. To test this hypothesis, the two highest doses of GHB (50 and 100 mg/kg) were administered during the acquisition phase, with threshold doses of cocaine (3 and 1.5 mg/kg). Although all the groups increased the time in the drug-paired compartment, this global increase did not reach statistical significance, except in the group receiving 3 mg/kg of cocaine. Thus, high GHB doses do not block the rewarding potency of low cocaine doses, although they do not increase them. Nevertheless, when administered jointly with a potent cocaine dose, GHB is able to block this rewarding effect of cocaine. This intriguing fact can be explained by a reduction of cocaine-induced hyperactivity. To check this possibility, this high GHB dose was administered with 50 mg/kg of cocaine and the motor activity was measured for 6 h. GHB did not counteract the cocaine-induced hyperactivity, or conversely 50 mg/kg of cocaine was able to reverse the locomotor depressant effects of 100 mg/kg of GHB. Thus, an impairment of locomotion does not seem to be the cause of the lack of CPP induced by the highest GHB dose. Another possible explanation is a wide receptor blockade profile induced by this dose, affecting not only the high affinity GHB receptors but also other receptors such as GABA-B. The GABA-B receptor agonist baclofen has been shown to reduce the cocaine-evoked DA release in the nucleus accumbens (Fadda *et al.*, 2003) and equally attenuated the rewarding effects of cocaine (Slattery *et al.*, 2005). Thus, high doses of GHB can mimic these properties of GABA-B agonist receptors. Finally, the delayed activation of DA neurotransmission produced by GHB can confuse the conditioning procedure, as the animal can experience a longer reinforcing effect than those that receive only cocaine. After the administration of both drugs, the animals experience a short and more rapid reward owing to cocaine when they are in the drug-paired compartment and a later and longer reinforcement owing to GHB action when they have returned to their cages. Intermediate doses of GHB could induce lower DA activation; thus, the cocaine conditioning would be less affected. On the other hand, GHB is generally considered to induce its central effects through a diminution of DA release secondary to its inhibitory effects on DA cell firing, with microdialysis studies confirming a decrease in the striatum DA release (Howard and Feigenbaum, 1997). The fact that a low dose of 12.5 mg/kg caused a blocking effect could be due to different causes, such as a different percentage of high or low-affinity receptor occupancy or its influence on DA neurotransmission being different from that produced by higher doses. The decrease in DA release is consonant with the behavioural effects of GHB administration, which are strikingly similar to those observed in drugs inhibiting this release. A mixed antagonism of D1 and D2

DA receptors could block the expression of cocaine preference (Liao *et al.*, 1998), and by the same mechanisms GHB could induce a blockade of this preference.

On the other hand, GHB did not affect the expression of the preference for the cocaine-paired compartment. As the CPP test is administered the day after the last conditioning session in drug-free animals, the expression of CPP is dependent on memory processes, including acquisition, consolidation and retrieval mechanisms. A number of empirical results have confirmed the role of memory processes in drug-induced CPP (Cervo and Samanin, 1995; Tzschentke and Schmidt, 1995; Itzhak and Martin, 2000). Although GHB has been reported to impair learning (Sircar and Basak, 2004), no apparent deficits were observed with our paradigm when it was administered prior to the test probe. During the postconditioning test, the mice, under the effect of GHB, confined themselves to the drug-paired compartment most of the time, which could be considered as a new type of training that could affect further reinstatement processes. Studies on the rewarding effects of GHB measured with the CPP procedure suggest that after only one trial, this would be quite atypical, as an elevated number of trials are necessary to obtain GHB-induced preference (Fattore *et al.*, 2000; Itzhak and Ali, 2002).

Despite the particular actions of GHB on the acquisition or expression phase of cocaine-induced preference, animals treated with GHB in either of these two phases but showing a preference for the cocaine-paired compartment do not reinstate this preference after receiving a priming injection of 25 mg/kg of cocaine, as control animals do. Although GHB does not affect the acquisition or expression of CPP in these groups, the neurobiological processes underlying reinstatement after a priming injection are affected in these animals, altering the relapse phenomenon. GHB could decrease the potency of the conditioning when administered during the acquisition phase, possibly because of the previously mentioned delayed action on DA neurotransmission. Although these animals partially restore the preference after the priming dose of cocaine, this reinstatement is not complete, as the preference is significantly lower than that expressed during Post-C, the effect being mainly due to the group receiving the lowest GHB dose (6.25 mg/kg). On the other hand, protracted memory impairments could account for the lack of relapse in the groups receiving GHB during the expression. This effect does not seem to be dose dependent, as none of the GHB doses administered during the expression blocks the reinstatement of the preference.

In animals normally conditioned with cocaine, after extinction was achieved, GHB blocked cocaine-induced reinstatement (25 mg/kg) and no dose was able to reinstate this preference by itself. Once more, GHB affects cocaine-rewarding processes in a narrow range of doses, as only with

an intermediate dose does it block the reinstatement of this preference when administered jointly with the priming dose of cocaine. We have previously observed a particular response after this GHB dose with the same strain of mice. Expression of the conditioned place aversion induced in morphine-dependent animals by naloxone administration was blocked by a wide range of GHB doses, with the exception of 25 mg/kg, which was the only dose capable, by itself, of inducing aversion in morphine-dependent animals (Maldonado *et al.*, 2004). Hence, a specific balance regarding GHB receptor occupancy and/or DA neurotransmission activation seems to take place with this specific GHB dose. As we have previously mentioned, the priming dose reminds the animal of the hedonic properties of the drug and the significance of the cues previously paired with the drug (Mueller and Stewart, 2000). GHB could block this process, probably altering the subjective perception of the hedonic effect of cocaine; thus, the animals do not recognize it as the conditioning drug. Again, higher doses were not effective, suggesting an inherent capacity to trigger relapse by themselves. None of the GHB doses used in this study, however, was able to reinstate the preference for the cocaine-paired compartment. Cross-reinstatement has been reported for cocaine and other psychostimulants (Itzhak and Martin, 2002), but no cross-reinstatement is obtained with GHB.

In conclusion, GHB does not enhance the rewarding properties of cocaine, evaluated using the paradigm of CPP, as it is ineffective or even decreases preference, depending on the process studied. In general, higher GHB doses do not produce stronger effects, this narrow margin of dose being an important problem when considering this drug as a possible tool for treating cocaine addicts. The most promising results were that the relapse in cocaine-seeking behaviour could be blocked by GHB when administered during the acquisition of the conditioning procedure, the expression, or even, jointly with a priming dose of cocaine. The results presented here confirm that GHB could alter cocaine-rewarding and cocaine-seeking behaviour and this point has to be taken into consideration in the treatment of frequently occurring poly-drug cocaine abusers.

Acknowledgements

We wish to thank Ms Miriam Phillips for the revision of the manuscript in English.

References

- Addolorato G, Cibin M, Caputo F, Capristo E, Gessa GL, Stefanini GF, Gasbarrini G (1998). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcoholism: dosage fractioning utility in non-responder alcoholic patients. *Drug Alcohol Depend* **53**:7–10.
- Bellis MA, Hughes K, Bennett A, Thomson R (2003). The role of an international nightlife resort in the proliferation of recreational drugs. *Addiction* **98**: 1713–1721.
- Brabant C, Quertemont E, Tirelli E (2005). Influence of the dose and the number of drug-context pairings on the magnitude and the long-lasting retention of cocaine-induced conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology* **180**:33–40.
- Broughton R, Mamelak M (1979). The treatment of narcolepsy-catalepsy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci* **6**:1–6.
- Campbell J, Nickel EJ, Penick EC, Wallace D, Gabrielli WF, Rowe C, *et al.* (2003). Comparison of desipramine or carbamazepine to placebo for crack cocaine-dependent patients. *Am J Addict* **12**:122–136.
- Cervo L, Samanin R (1995). Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Res* **673**:242–250.
- Cheramy A, Nieoullon A, Glowinski J (1977). Stimulating effects of γ -hydroxybutyrate on dopamine release from the caudate nucleus and the substantia nigra of the cat. *J Pharmacol Exp Ther* **202**:283–293.
- Cunningham CL, Dickinson SD, Grahame NJ, Okorn DM, McMullin CS (1999). Genetic differences in cocaine-induced conditioned place preference in mice depend on conditioning trial duration. *Psychopharmacology* **146**:73–80.
- Di Chiara G (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* **137**:75–114.
- Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5274–5278.
- Diana M, Mereu G, Mura A, Fadda F, Passino N, Gessa GL (1991). Low doses of γ -hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* **566**:208–211.
- Fadda P, Scherma M, Fresu A, Collu M, Fratta W (2003). Baclofen antagonizes nicotine-, cocaine-, and morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of rat. *Synapse* **50**:1–6.
- Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Fratta W (2000). Gamma-hydroxybutyric acid: an evaluation of its rewarding properties in rats and mice. *Alcohol* **20**:247–256.
- Gallimberti L, Canton G, Gentile N, Ferri M, Cibin M, Gerra SD, *et al.* (1989). Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Lancet* **2**:787–789.
- Gallimberti L, Ferri M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL (1992). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double-blind study. *Alcohol Clin Exp Res* **16**:673–676.
- Gallimberti L, Cibin M, Pagnin P, Sabbion R, Pani PP, Pirastu R, *et al.* (1993). Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opioid withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology* **9**:77–81.
- Gallimberti L, Schifano F, Forza G, Miconi L, Ferrara SD (1994). Clinical efficacy of gamma-hydroxybutyric acid in treatment of opiate withdrawal. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **244**:113–114.
- Gallimberti L, Spella MR, Soncini CA, Gessa GL (2000). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol and heroin dependence. *Alcohol* **20**: 257–262.
- Hechler V, Gobaille S, Bourguignon J, Maitre M (1991). Extracellular events induced by γ -hydroxybutyrate in striatum: a microdialysis study. *J Neurochem* **56**:938–944.
- Hechler V, Gobaille S, Maitre M (1992). Selective distribution pattern of gamma-hydroxybutyrate receptors in the rat forebrain and midbrain as revealed by quantitative autoradiography. *Brain Res* **572**:345–348.
- Howard SG, Feigenbaum JJ (1997). Effect of gamma-hydroxybutyrate on central dopamine release *in vivo*. A microdialysis study in awake and anesthetized animals. *Biochem Pharmacol* **53**:103–110.
- Hurd YL, Ungerstedt U (1989). Cocaine: an *in vivo* microdialysis evaluation of its acute action on dopamine transmission in rat striatum. *Synapse* **3**:48–54.
- Itzhak Y, Ali SF (2002). Repeated administration of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) to mice: assessment of the sedative and rewarding effects of GHB. *Ann NY Acad Sci* **965**:451–460.
- Itzhak Y, Martin JL (2000). Scopolamine inhibits cocaine-conditioned but not unconditioned stimulant effects in mice. *Psychopharmacology* **152**: 216–223.
- Itzhak Y, Martin JL (2002). Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* **26**:130–134.
- Koob GF (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* **13**:177–184.
- Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E (2002). Pharmacotherapy of addictions. *Nat Rev Drug Discov* **1**:710–726.
- Liao RM, Chang YH, Wang SH (1998). Influence of SCH23390 and spiperone on the expression of conditioned place preference induced by *D*-amphetamine or cocaine in the rat. *Chin J Physiol* **41**:85–92.
- Maitre M (1997). The γ -hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* **51**:337–361.
- Maldonado C, Rodriguez-Arias M, Aguilar MA, Minarro J (2004). GHB ameliorates naloxone-induced conditioned place aversion and physical

- aspects of morphine withdrawal in mice. *Psychopharmacology* **177**:130–140.
- Martellota MC, Balducci C, Fattore L, Cossu G, Gessa GL, Pulvirenti L, Fratta W (1998). Gamma-hydroxybutyric acid decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **59**:697–702.
- Mueller D, Stewart J (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res* **115**:39–47.
- Nicholson KL, Balster RL (2001). GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend* **63**:1–22.
- Pistis M, Muntoni AL, Pillolla G, Perra S, Cignarella G, Melis M, Gessa GL (2005). Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and the mesoaccumbens reward circuit: evidence for GABAB receptor-mediated effects. *Neuroscience* **131**:465–474.
- Raby WN, Coomaraswamy S (2004). Gabapentin reduces cocaine use among addicts from a community clinic sample. *J Clin Psychiatry* **65**:84–86.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J (2003). Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural Plast* **10**:279–290.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J (2005). NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res Bull* **64**:493–503.
- Romieu P, Meunier J, Garcia D, Zozime N, Martin-Fardon R, Bowen WD, Maurice T (2004). The sigma1 (sigma1) receptor activation is a key step for the reactivation of cocaine conditioned place preference by drug priming. *Psychopharmacology* **175**:154–162.
- Sanchez CJ, Bailie TM, Wu WR, Li N, Sorg BA (2003). Manipulation of dopamine d1-like receptor activation in the rat medial prefrontal cortex alters stress- and cocaine-induced reinstatement of conditioned place preference behavior. *Neuroscience* **119**:497–505.
- Schmidt-Mutter C, Gobaille S, Muller C, Maitre M (1999). Prodynorphin and proenkephalin mRNAs are increased in rat brain alters acute and chronic administration of gamma-hydroxybutyrate. *Neurosci Lett* **262**:65–68.
- Seale TW, Carney JM (1991). Genetic determinants of susceptibility to the rewarding and other behavioral actions of cocaine. *J Addict Dis* **10**:141–162.
- Shoptaw S, Kintaudi PC, Charuvastra C, Ling W (2002). A screening trial of amantadine as a medication for cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **66**:217–224.
- Sircar R, Basak A (2004). Adolescent gamma-hydroxybutyric acid exposure decreases cortical N-methyl-D-aspartate receptor and impairs spatial learning. *Pharmacol Biochem Behav* **79**:701–708.
- Slattery DA, Markou A, Froestl W, Cryan JF (2005). The GABAB receptor-positive modulator GS39783 and the GABA(B) receptor agonist baclofen attenuate the reward-facilitating effects of cocaine: intracranial self-stimulation studies in the rat. *Neuropsychopharmacology* **30**:2065–2072.
- Szumliński KK, Price KL, Frys KA, Middaugh LD (2002). Unconditioned and conditioned factors contribute to the 'reinstatement' of cocaine place conditioning following extinction in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* **136**:151–160.
- Tzschentke TM (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* **56**:613–672.
- Tzschentke TM, Schmidt WJ (1995). N-methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neurosci Lett* **193**:37–40.
- Uchimura N, North RA (1991). Baclofen and adenosine inhibit synaptic potentials mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate release in rat nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* **258**:663–668.
- van den Brink W, van Ree JM (2003). Pharmacological treatments for heroin and cocaine addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* **13**:476–487.
- Zhang Y, Mantsch JR, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ (2002). Conditioned place preference after single doses or 'binge' cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. *Pharmacol Biochem Behav* **73**:655–662.

7. DISCUSIÓN

GENERAL



7. DISCUSIÓN GENERAL

El interés fundamental de la presente Tesis Doctoral fue el de aportar desde una perspectiva conductual, información relevante acerca del papel del sistema glutamatérgico y del GHB en la adicción a los opiáceos y a los psicoestimulantes. En particular su implicación en la adicción a la morfina y a la cocaína.

Los resultados obtenidos en cada uno de los seis estudios llevados a cabo nos dan una información muy valiosa acerca de la relación entre estos sistemas de neurotransmisión y la adicción, el análisis conjunto de toda esta información nos va a ofrecer una visión más amplia sobre el complejo fenómeno de la adicción a las drogas.

La conducta agresiva y el consumo de drogas se presentan simultáneamente con mucha frecuencia. En algunas ocasiones asociada al consumo de la sustancia, como por ejemplo ocurre con la cocaína, o en otras, presente durante el síndrome de abstinencia, como sería el caso de la morfina. La administración de morfina induce un conocido efecto antiagresivo (Rodríguez-Arias y cols., 1997, 2001), y en la presente Tesis hemos observado como este efecto parece ser independiente de la neurotransmisión glutamatérgica, estudiada mediante el bloqueo de los receptores NMDA con memantina. Tampoco la administración de GHB, que estimula los receptores GABA_B y además interfiere en el sistema dopaminérgico, ha obstaculizado esta acción. Tanto la memantina como el GHB son sustancias que por si mismas poseen acciones antiagresivas, pero cuando se administran en unas dosis en las cuales todavía no se observa este efecto y sin embargo si alteran los mencionados sistemas de neurotransmisión, no se ha visto que afecten a las acciones antiagresivas de la morfina.

Una situación diferente se observa cuando se estudia la hiperactividad motora inducida por morfina. Aunque la memantina por sí misma induce incrementos en la locomoción, cuando se administra conjuntamente con morfina los animales tratados permanecen más tiempo en la conducta de inmovilidad. Este fenómeno nos indica que al bloquear los receptores NMDA, la estimulación de los receptores μ no puede ejercer su efecto motor y que además se produce un deterioro de esta conducta. El efecto depresor que sobre la actividad ejerce la morfina se ha observado que se prolonga en animales tratados con antagonistas del receptor NMDA, lo cual apoya nuestros resultados (Trujillo y Akil, 1994) y además la memantina también inhibe la tolerancia que se desarrolla a los efectos depresores que la morfina ejerce sobre la actividad motora (Trujillo, 2003). Otros trabajos también han observado esta misma relación, centrándose fundamentalmente en el estudio de la sensibilización motora tras la administración repetida de morfina (del Rosario y cols., 2002; Kosten y Bombace, 2000), aunque otros estudios no han observado este efecto (Ranaldi y cols., 2000).

Por otra parte, el GHB contrarresta de forma eficaz la hiperactividad inducida por morfina, y sin embargo no provoca una disminución de la actividad cuando se administra conjuntamente con una dosis no efectiva de morfina. Hemos comprobado como tampoco la activación de los receptores GHB específicos y los GABA_B (activados respectivamente por dosis bajas y altas de GHB) no altera las acciones antiagresivas de la morfina. Sin embargo sí que reduce de forma contundente la hiperactividad inducida por esta. La relación entre el sistema opiáceo y el GHB se apoya en diferentes hechos, en la liberación proencefalinas producida por el GHB (Schmidt-Mutter y cols., 1999), que sus efectos puedan ser imitados por los agonistas (Bernasconi y cols., 1999) o bloqueados por los antagonistas opiáceos (Snead y Bearden, 1980; Maitre, 1997), o tal y como se ha descrito

recientemente, que el GHB disminuya el craving inducido por la administración de naltrexona (Caputo y cols., 2005). Ya que esta relación no se basa en la ocupación de los respectivos receptores, pensamos que se produce a través de las acciones del GHB sobre otros sistemas de neurotransmisión, principalmente la DA o el GABA (Feigenbaum y Howards, 1997).

El estudio de las conductas sociales y de la actividad motora nos confirma que existe una relación entre el sistema opiáceo, glutamatérgico y el GHB y que esta interacción dependerá de la conducta estudiada. Ya que ambos sistemas modulan de forma más o menos directa la liberación de DA, podemos sugerir que los efectos motores observados se deberían a una afectación de esta neurotransmisión debida o bien al bloqueo de los receptores NMDA a la estimulación de los receptores del GHB o GABA_B.

La administración continuada de drogas de abuso induce la aparición de dependencia a estas sustancias debido a los cambios adaptativos producidos en diferentes sistemas neurales que se relacionan con el fenómeno de la plasticidad sináptica. Para estudiar la dependencia a una droga hemos de interrumpir su consumo y así observaremos como esos cambios neurales se ponen de manifiesto, apareciendo lo que se conoce como síndrome de abstinencia. La adicción a los opiáceos produce un dramático síndrome de abstinencia que presenta tanto alteraciones de tipo físico como motivacional.

El importante papel que los receptores NMDA juegan en la plasticidad sináptica nos sugiere que estos podrían ser críticos en el desarrollo de la dependencia a opiáceos. Igualmente, diferentes informes clínicos han otorgado un papel al GHB como fármaco adecuado para mejorar el síndrome de abstinencia a estas drogas. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha se han centrado especialmente en el

aspecto físico de la abstinencia a opiáceos, no habiéndose realizado casi estudios que evaluaran el aspecto psicológico o motivacional de esta abstinencia. Para el estudio del síndrome de abstinencia motivacional uno de los paradigmas más empleados es el condicionamiento aversivo de lugar.

Nuestros resultados han confirmado que tanto los receptores NMDA como el GHB juegan un papel importante en la abstinencia, tanto física como motivacional a la morfina. Cuando la dependencia a la morfina se desarrolla durante el bloqueo de los receptores NMDA con memantina o MK-801, el síndrome de abstinencia no es apreciable. Igualmente en un animal dependiente de morfina, el bloqueo de estos receptores es capaz de inhibir la aparición de la abstinencia inducida por la administración de naloxona. Por tanto lo que nos están indicando nuestros resultados es que, tanto los aspectos físicos como motivacionales aversivos de la abstinencia a la morfina están mediados, al menos en parte por los receptores NMDA.

Igualmente hemos observado que el GHB es útil, tanto para mejorar los signos físicos como los motivacionales de abstinencia a la morfina, aunque sus efectos parecen ser de corta duración. Debido al importante papel que la DA juega en la abstinencia a la morfina, este neurotransmisor podría ser uno de los más directamente implicados en los efectos que produce el GHB. También hay que tener en consideración que el GHB incrementa la liberación de opiáceos endógenos, lo cual puede ayudar a disminuir los síntomas de la abstinencia.

Nuestro trabajo apoya por tanto un posible papel de la memantina y del GHB como potenciales herramientas en el tratamiento de la abstinencia a opiáceos. Es importante señalar que no hemos observado la presencia de efectos reforzantes tras administrar GHB, ya que las dosis utilizadas, y que se han mostrado efectivas son muy bajas. De especial importancia es el

hecho de que ambas sustancias han sido capaces de bloquear la aversión asociada a lugar de la abstinencia, lo cual sería de gran ayuda para el tratamiento de toxicómanos en rehabilitación ya que, en muchas ocasiones, la exposición a lugares asociados a la morfina (o a su carencia) puede desencadenar la aparición de *craving* por la droga.

El *craving* o deseo por la droga es una de las características más importantes de la conducta adictiva, siendo un fenómeno a largo plazo que puede presentarse tras largos periodos de abstinencia, llevando en muchas ocasiones a reiniciar el consumo, fenómeno conocido como recaída (Eptein y Preston, 2003). A diferencia del *craving*, que es subjetivo y por tanto muy difícil de estudiar con modelos animales, la recaída es una conducta operante definida como el reinicio de la búsqueda y consumo de la droga. El paradigma de CPL, que valora la capacidad de los estímulos asociados con la droga para inducir la conducta de búsqueda y consumo de la misma, es un modelo animal ampliamente utilizado para estudiar las propiedades reforzantes de las drogas. En los últimos años se han producido una gran número de trabajos dedicados al estudio de la recaída, utilizando la mayoría de ellos el paradigma de la autoadministración (Shaham y Miczek, 2003). Nuestro grupo de investigación ha venido desarrollando una serie de estudios en los cuales hemos empleado y validado el CPL como paradigma para estudiar la recaída en el consumo de morfina. Tras la inducción de la preferencia de lugar, los animales son sometidos a diferentes protocolos de extinción del condicionamiento, observándose que, al igual que se ha demostrado en los estudios de autoadministración, diferentes estímulos pueden desencadenar la reinstauración de la preferencia por el compartimiento asociado con la morfina (Ribeiro Do Couto, Tesis Doctoral 2005). Por ejemplo, tras una extinción diaria, el condicionamiento se extingue aproximadamente tras 7 sesiones y diferentes dosis priming de morfina (mucho más bajas que las utilizadas para el condicionamiento) son capaces de reinstaurar la preferencia por el compartimiento asociado a la

droga (Ribeiro do Couto y cols., 2003). Hemos observado que la duración del condicionamiento esta en función del protocolo de extinción utilizado, observándose con cualquiera de los empleados, una reinstauración de la preferencia tras la administración de dosis priming (Ribeiro do Couto y cols., 2005a). Por otra parte, la reinstauración también puede inducirse mediante la administración de otras drogas diferentes a la utilizada en el condicionamiento (morfina) como cocaína o anfetamina (Ribeiro do Couto y cols., 2005c). Por último, hemos demostrado que la exposición a diferentes tipos de estresores (físicos o sociales) también induce la reinstauración del condicionamiento (Ribeiro do Couto y cols., 2006).

En la presente tesis doctoral, hemos querido en primer lugar, validar el procedimiento de CPL como modelo para estudiar la recaída en el consumo de cocaína. Hemos demostrado como tras la extinción de la preferencia, utilizando sesiones semanales, la administración de una dosis menor (hasta un 25%) a la empleada durante el condicionamiento, reinstaura la preferencia por el compartimiento asociado a la cocaína.

Una vez demostrada la validez del CPL como modelo de recaída para la cocaína, quisimos ampliar los estudios sobre los diferentes sistemas de neurotransmisión implicados en los procesos neurobiológicos subyacentes tanto a las propiedades reforzantes como a la recaída en el consumo de cocaína. En estudios previos, habíamos observado que el bloqueo de los receptores NMDA con memantina impedía la adquisición del CPL inducido por morfina (Ribeiro do Couto y cols., 2004). De forma similar, el bloqueo de los receptores NMDA o de los AMPA es capaz de bloquear tanto la adquisición como la expresión del CPL inducido por cocaína.

Dados los buenos resultados obtenidos con el GHB en la dependencia a la morfina, nos planteamos evaluar si esta sustancia era capaz de interferir con las propiedades reforzantes de la cocaína. Tanto la

cocaína como el GHB incrementan la DA estriatal, por lo que cabría esperar una potenciación del refuerzo al administrar conjuntamente ambas drogas, sin embargo no hemos obtenido este resultado. En concreto dosis umbrales de cocaína administradas junto a dosis altas de GHB no presentan una mayor preferencia.

El GHB sólo es capaz de bloquear la adquisición con dosis puntuales, no afectando la expresión de la preferencia inducida por cocaína. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los receptores NMDA y los AMPA son necesarios para el establecimiento del CPL inducido por cocaína. Sin embargo, el GHB no parece jugar un papel crítico ni para el establecimiento ni para la expresión de esta preferencia.

Previamente habíamos demostrado que los antagonistas del receptor NMDA bloqueaban la reinstauración de la preferencia inducida por morfina (Ribeiro do Couto y cols., 2005b). Sin embargo, en el presente estudio, ni el bloqueo de los receptores NMDA ni el de los AMPA es capaz de impedir la recaída inducida por dosis priming de cocaína. Por lo tanto, podemos afirmar que, aunque los receptores de glutamato parecen estar fuertemente involucrados en los procesos de adquisición del condicionamiento tanto de la morfina como de la cocaína, no es así para los procesos neurobiológicos implicados en la reinstauración de la preferencia. Los receptores de glutamato parece ser sólo necesarios para reinstaurar la preferencia inducida por dosis priming de morfina (al menos los NMDA). Sin embargo ni los AMPA ni los NMDA parecen ser necesarios para desencadenar la reinstauración de la preferencia inducida por dosis priming de cocaína. Puede que la mayor estimulación del sistema dopaminérgico, en comparación con el glutamatérgico, que ocurre tras la administración de cocaína (en comparación con la morfina), pueda explicar esta falta de efecto (Bossert y cols., 2005). Los antagonistas de los receptores DA, por su parte, no bloquean la reinstauración inducida por morfina, lo cual apoyaría

que el sistema glutamatérgico tendría un papel más relevante en la reinstauración inducida por morfina, siendo sin embargo el sistema dopaminérgico el más fuertemente implicado en la reinstauración inducida por cocaína (Ribeiro do Couto y cols., 2005b).

Por su parte el GHB tampoco es capaz de inducir recaída en ratones condicionados con cocaína. Sin embargo, el GHB es capaz de impedir la reinstauración de la preferencia cuando se administra ya sea durante la adquisición o la expresión del condicionamiento. Aunque estos animales muestren preferencia por el lugar asociado con la cocaína, no recaen tras recibir una dosis priming de cocaína. Por lo tanto los procesos neurobiológicos que subyacen a la recaída han sido alterados en estos animales. Puede que el condicionamiento se haya producido de forma más débil, o que el GHB asociado a la cocaína modifique los efectos de la misma. La cinética que el GHB ejerce sobre la liberación de DA es diferente de aquella producida por la cocaína, pudiendo afectar al proceso de condicionamiento. No debemos descartar tampoco que los ratones puedan presentar problemas de memoria a largo plazo. No obstante, cuando el condicionamiento se establece de forma adecuada, aunque el GHB no es capaz de inducir la reinstauración, tampoco puede bloquear el efecto de una dosis priming de cocaína, excepto con una franja de dosis muy pequeña.

En general podemos concluir que los estudios realizados hasta el momento por nosotros apoyan la existencia de una disociación en los procesos neurobiológicos que subyacen a los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso y aquellos que controlan la recaída. La neurotransmisión glutamatérgica sería crítica para el establecimiento del aprendizaje entre un determinado ambiente y los efectos apetitivos de las drogas, mientras que su papel en la recaída inducida por dosis priming se centraría fundamentalmente en la morfina, no así para la cocaína. También jugarían un importante papel en el desarrollo de la dependencia a opiáceos,

siendo relevante en la aparición del síndrome de abstinencia tanto físico como motivacional. El GHB se ha mostrado eficaz en tratar la dependencia a opiáceos, pero no parece ser de tanta ayuda como posible herramienta de tratamiento para consumidores de cocaína. Sin embargo, aunque el GHB mejoraría fundamentalmente el síndrome de abstinencia a opiáceos, dada la frecuencia de poli consumo entre los consumidores de drogas, también podría disminuir, en cierta medida, el riesgo de recaída en el consumo de cocaína.



8. CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

1º Estudio: La Memantina no bloquea los efectos antiagresivos de la morfina en ratones.

- 1- La administración de memantina (40 mg/kg) incrementa la actividad motora.
- 2- Tras la administración de 20 o 40 mg/kg de memantina se produce una abolición de las conductas agresivas observadas en ratones aislados.
- 3- Se observa un incremento en el tiempo dedicado a los contactos sociales, sólo tras la dosis de 20 mg/kg de memantina.
- 4- Las dosis altas de memantina producen ataxia en un elevado porcentaje de animales
- 5- La memantina no modifica el efecto antiagresivo inducido por la morfina
- 6- La administración de memantina y morfina produce inmovilidad en los animales

2º Estudio: La memantina presenta efectos diferentes del MK-801 en los signos motivacionales y físicos en la abstinencia a la morfina.

- 1- La administración de 0,25 mg/kg de naloxona en ratones dependientes de la morfina induce CAL.

- 2- La memantina y el MK-801 no presentan efectos motivacionales en ratones dependientes de la morfina.
- 3- Cuando la dependencia a la morfina se desarrolla encontrándose bloqueados los receptores NMDA, por la co-administración de memantina (10 mg/kg) o MK-801 (0,05 y 0,1 mg/kg), no se desarrolla CAL al compartimento asociado a la inyección de naloxona.
- 4- La administración de memantina (10 mg/kg) o MK-801 (0,1 y 0,3 mg/kg) durante la fase de adquisición del CAL (sesiones de condicionamiento), en ratones dependientes de la morfina, bloquea la aparición de la aversión condicionada.
- 5- La administración de memantina (10 mg/kg) o cualquiera de las dosis de MK-801 utilizadas (0,006 a 0,3 mg/kg) en la fase de expresión del CAL (día del Post-condicionamiento) bloquea la aparición de la aversión condicionada.
- 6- Los animales dependientes de la morfina que reciben 1 mg/kg naloxona desarrollan un síndrome de abstinencia físico con la presencia de saltos, temblor de cuerpo, temblor de patas y una puntuación entre 12 y 15 en la escala de Gellert y Holtzman.
- 7- La administración memantina o MK-801 en ratones dependientes de la morfina no induce ningún signo de abstinencia física.
- 8- En los animales dependientes de la morfina, en los cuales la administración de naloxona ha sido precedida por una dosis de 10 mg/kg de memantina o por cualquiera de las dosis de MK-801, la

administración de naloxona no ha inducido signos físicos de abstinencia, obteniendo estos animales una puntuación en la escala de Gellert y Holtzman entre 6 y 12 puntos.

- 9- Los animales que han desarrollado la dependencia a la morfina con un bloqueo de los receptores NMDA, debido a la co-administración de memantina (10 mg/kg) o MK-801 (0,5 y 1 mg/kg) presentan una disminución en la intensidad de los signos físicos de abstinencia, con una puntuación en la escala de Gellert y Holtzman que va desde 5 hasta 8 puntos.

3º Estudio: Los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA bloquean la adquisición y la expresión pero no la reinstauración de la preferencia de lugar inducida por cocaína en ratones.

- 1- Ni el bloqueo de los receptores NMDA con la administración de la memantina o el de los AMPA con la administración del CNQX, induce efectos motivacionales utilizando el CPL.
- 2- Cuando se administra memantina (10 mg/kg) o CNQX (10 mg/kg) durante la fase de adquisición (sesiones de condicionamiento) del CPL inducido por cocaína, se bloquea la aparición de la preferencia.
- 3- Cuando se administra memantina (5 y 10 mg/kg) o CNQX (10 mg/kg) durante la fase de expresión (post-condicionamiento) del CPL inducido por cocaína, se bloquea la aparición de la preferencia.
- 4- El bloqueo de los receptores NMDA o AMPA no induce reinstauración de la preferencia en ratones condicionados con cocaína.

- 5- El bloqueo de los receptores NMDA o AMPA no impide la reinstauración de la preferencia inducida por dosis *priming* de cocaína

4º Estudio: El GHB actúa de forma diferente sobre la actividad motora y las conductas sociales afectadas por las acciones de la morfina en ratones macho

- 1- La administración de GHB (200 y 400 mg/kg) induce una disminución de la actividad motora.
- 2- La hiperactividad motora inducida por 50 mg/kg de morfina es contrarrestada, de forma dosis-dependiente por el GHB (desde 100 a 400 mg/kg).
- 3- La dosis de 10 mg/kg de morfina no afecta a la actividad motora, no observándose tampoco cambios cuando se administra conjuntamente con cualquiera de las dosis de GHB (desde 25 a 400 mg/kg).
- 4- El GHB (200 mg/kg) incrementa el tiempo que los ratones aislados dedican a las conductas de interacción social y disminuye la agresión, incrementando la inmovilidad.
- 5- La morfina (10 mg/kg) disminuye específicamente las conductas agresivas de los ratones aislados.

- 6- La co-administración de morfina mas GHB (25 y 100 mg/kg) incrementa el tiempo que los animales dedican a la exploración no social.
- 7- La co-administración de morfina y cualquiera de las dosis de GHB (de 25 a 200 mg/kg) no afecta a las acciones antiagresivas del agonista opiáceo, incluso se ven potenciadas, aunque se produce un incremento progresivo del tiempo que los animales se encuentran inmóviles.

5º Estudio: El GHB mejora el condicionamiento aversivo de lugar y los síntomas físicos del síndrome de abstinencia a la morfina inducido por naloxona en ratones.

- 1- En ratones dependientes de la morfina la administración de naloxona induce una aversión al lugar asociado a este antagonista opiáceo a partir de la dosis de 0,125 mg/kg.
- 2- La administración de GHB (6 a 50 mg/kg) en animales no previamente expuestos a opiáceos no induce efectos motivacionales.
- 3- La administración de GHB (6 a 50 mg/kg) en animales dependientes de la morfina no induce efectos motivaciones, excepto con la dosis de 25 mg/kg que produce CAL.
- 4- La administración de GHB (12 a 50 mg/kg) durante la fase de adquisición del CAL (sesiones de condicionamiento) en ratones dependientes de la morfina bloquea la aparición de la aversión condicionada.

- 5- La administración de GHB (6 a 50 mg/kg) en la fase de expresión del CAL (día del Post-condicionamiento) bloquea la aparición de la aversión condicionada.
- 6- Los animales dependientes de la morfina que reciben 1 mg/kg naloxona desarrollan un síndrome de abstinencia físico caracterizado por la presencia de saltos, temblor de cuerpo, temblor de patas y una puntuación entre 13 y 15 en la escala de Gellert y Holtzman.
- 7- La administración GHB (6 a 25 mg/kg) en ratones dependientes de la morfina no induce ningún signo de abstinencia física.
- 8- En los animales dependientes de la morfina en los cuales la administración de naloxona ha sido precedida por una dosis de 25 mg/kg de GHB, aparecen escasos signos físicos de abstinencia, obteniendo estos animales una puntuación en la escala de Gellert y Holtzman entre 6 y 9 puntos.
- 9- En los ratones dependientes de la morfina que sufren una abstinencia espontánea (48 horas después de la última dosis de morfina), se observa la presencia de temblor de patas, de cuerpo y saltos.
- 10- La administración de GHB (12 y 25 mg/kg) en ratones en abstinencia espontánea, reduce o anula los signos físicos de abstinencia, pero sólo durante las primeras 3 horas tras su administración.

6º El ácido Gamma-hidroxi-butírico afecta la adquisición y la reinstauración de la preferencia de lugar inducida por cocaína en ratones.

- 1- La cocaína induce un CPL con dosis iguales o superiores a 3,1 mg/kg.
- 2- Una vez extinguido en CPL inducido por 25 y 50 mg/kg de cocaína, se reinstaura tras la administración de una dosis *priming* de cocaína (mitad de la dosis empleada en el condicionamiento)
- 3- La administración de 12,5 y 100 mg/kg de GHB durante la fase de adquisición (sesiones de condicionamiento) del CPL inducido por 50 mg/kg de cocaína, bloquea la aparición de esta preferencia.
- 4- La administración de 50 o 100 mg/kg de GHB durante la fase de adquisición del CPL inducido por dosis umbral de cocaína (1,5 y 3 mg/kg) no incrementa la preferencia.
- 5- La administración de GHB (de 6,25 a 100 mg/kg) durante la expresión (día del Post-condicionamiento) del CPL inducido por 50 mg/kg de cocaína, no impidió la aparición de esta preferencia.
- 6- En los grupos en los que se administró GHB, bien sea durante la fase de adquisición o de expresión del CPL, y este se produjo, una vez extinguida la preferencia, la administración de una dosis *priming* de cocaína (25 mg/kg) no reinstauró la preferencia en ningún caso.

Conclusiones

- 7- En animales condicionados con 50 mg/kg de cocaína, una vez extinguida la preferencia, la administración de una dosis de GHB (de 6,25 a 100 mg/kg) no indujo en ningún caso la reinstauración de la preferencia.
- 8- En animales condicionados con 50 mg/kg de cocaína, una vez extinguida la preferencia, la reinstauración de la preferencia tras la administración de una dosis *priming* de cocaína (25 mg/kg) se bloqueó al administrar una dosis de 25 mg/kg de GHB.
- 9- La hiperactividad motora inducida por 50 mg/kg de cocaína no es bloqueada por 100 mg/kg de GHB

9. REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addolorato G, Cibir M, Caputo F, Capristo E, Gessa GL, Stefanini GF, Gasbarrini G (1998). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcoholism: dosage fractioning utility in non-responder alcoholic patients. *Drug Alcohol Depend* 53(1):7-10.
- Azar MR, Jones BC, Schulteis G (2003). Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. *Psychopharmacology* 170:42-50.
- Bailey CP, Connor M (2005). Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* 5(1):60-8.
- Bals-Kubik R, Ableitner A, Herz A, Shippenberg TS (1993). Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264:489-495.
- Bania TC, Ashar T, Press G, Carey PM (2003). Gamma-hydroxybutyric acid tolerance and withdrawal in a rat model. *Acad Emerg Med* 10 (7): 697-704.
- Ben-Eliyahu S, Marek P, Vaccarino AL, Mogil JS, Sternberg WF, Liebeskind JC (1992). The NMDA receptor antagonist MK-801 prevents long-lasting non-associative morphine tolerance in the rat. *Brain Res.* 575: 304-308.
- Berman M, Taylor S, Marged B (1993). Morphine and human aggression. *Addict Behav* 18(3):263-8.

Referencias bibliográficas

- Bernasconi R, Mathivet P, Bischoff S, Marescaux C (1999). Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential? *Trends Pharmacol Sci* 20(4):135-41.
- Bhargava HN y Matwyshyn GA (1993). Dizocilpine (MK-801) blocks tolerance to the analgesic but not to the hyperthermic effect of morphine in the rat. *Pharmacology* 47: 344-350.
- Boshka SC, Welsman MH, Thor DH (1966). A technique for inducing aggression in rats utilizing morphine withdrawal. *Psychological Record* 16:541-43.
- Bossert JM, Ghitza UE, Lu L, Epstein DH, Shaham Y (2005). Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications. *Eur J Pharmacol* 526(1-3):36-50.
- Broseta I, Rodríguez-Arias M, Stinus L, Miñarro J (2002). Ethological análisis of morphine withdrawal with different dependence programs in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26 (2): 335-47.
- Busse GD, Riley AL (2004). Cocaine, but not alcohol, reinstates cocaine-induced place preferences. *Pharmacol Biochem Behav* 78(4): 827-33.
- Campbell UC, Lac ST y Carroll ME (1999). Effects of baclofen on maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* : 209–214.
- Cappendijk SL, De Vries R y Dzoljic MR (1993). Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal síndrome in morphine-dependent mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 3: 111-116.

- Caputo F, Vignoli T, Lorenzini F, Ciuffoli E, Del Re A, Stefanini GF, Addolorato G, Trevisani F, Bernardi M; Alcoholism Treatment Study Group (2005) Suppression of craving for gamma-hydroxybutyric acid by naltrexone administration: three case reports. *Clin Neuropharmacol* 28(2):87-9.
- Cervo L, Samanin R (1995). Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Res* 673(2):242-50.
- Chiamulera C, Borgo C, Galchetto S, Valerio E, Tessari M (1996). Nicotina restatement of nicotina self-administration alter long-term extinction. *Psychopharmacology* 127: 102-107.
- Colombo G, Agabio R, Balaklievskaia N, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1995). Oral self-administration of gamma-hydroxybutyric acid in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 285 (1): 103-107.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Fa M, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1998). Gamma-hydroxybutyric acid intake in ethanol-preferring SP and non preferring SNP rats. *Physiol Behav* 64 (2): 197-202.
- Cornish JL, Duffy P, Kalivas PW (1999). A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience* 93: 1359-1367.
- Cornish JL y Kalivas PW (2000). Glutamate transmisión in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci* 20:RC89.

Referencias bibliográficas

- Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G (1997) Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents—preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 21:455–68.
- Del Pozo E, Barrios M, Baeyens JM (1996). The NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) stereoselectively inhibits morphine-induced place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology* 125:209–13.
- Del Rosario CN, Pacchioni AM, Cancela LM. (2002) Influence of acute or repeated restraint stress on morphine-induced locomotion: involvement of dopamine, opioid and glutamate receptors. *Behav Brain Res* 134(1-2):229-38.
- De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJ (1998b). MK-801 reinstates drug-seeking behaviour in cocaine-trained rats. *Neuroreport* 9: 637-640.
- De Wit H y Stewart J (1981). Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 75: 134-143.
- Diana M, Mereu G, Mura A, Fadda F, Passino N, Gessa G (1991). Low doses of gamma-hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* 566(1-2):208-11.
- Diaz SL, Kemmling AK, Rubio MC, Balerio GN (2005). Morphine withdrawal syndrome: involvement of the dopaminergic system in prepubertal male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 82(4):601-7.

- Dworkin SI, Guerin GF, Co C, Goeders NE, Smith JE (1988b). Lack of an effect of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens on intravenous morphine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 30: 1051-1057.
- Dyer JE, Roth B, Hyma BA (2001). Gamma-hydroxybutyrate withdrawal syndrome. *Ann Emerg Med* 37 (2): 147-153.
- Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi C (1994). The NMDA receptor antagonists, LY74614 and MK-801, and nitric oxide synthase inhibitor, ng-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the μ -opioid morphine but not to κ -opioids. *Pain* 56:69-75.
- Epstein DH, Preston KL (2003). The reinstatement model and relapse prevention: a clinical perspective. *Psychopharmacology* 168(1-2):31-41.
- Ettenberg A, Pettit HO, Bloom FE y Koob GF (1982). Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: Mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology* 78: 204-209.
- Fadda F, Argiolas A, Melis MR (1983). Suppression of voluntary ethanol consumption in rats by gamma-butyrolactone. *Life Sci* 32: 1471-1477.
- Fadda F, Colombo G, Mosca E, Gessa GL (1989). Supresión by gamma-hydroxybutyric acid of ethanol withdrawal síndrome in rats. *Alcohol Alcohol* 24: 447-451.
- Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Fratta W (2000). Gammahydroxybutyric acid an evaluation of its rewarding properties in rats and mice. *Alcohol* 20:247-256.

Referencias bibliográficas

- Feigenbaum JJ, Simantov R (1996). Lack of effect of gamma-hydroxybutyrate on mu, delta and kappa opioid receptor binding. *Neurosci Lett* 212:5–8.
- Feigenbaum JJ, Howards G (1997). Naloxone reverses the inhibitory effect of gamma-hydroxybutyrate on central DA release in vivo in awake animals: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 224:71– 74.
- Feng YZ, Zhan T, Rockholk RW, Ho IK (1995). Increased locus coeruleus glutamate levels are associated with naloxone-precipitated withdrawal from butorphanol in the rat. *Neurochemical Res* 20:745-751.
- Fernandes M, Kluwe S y Coper H (1977). Quantitative assessment of tolerance to and dependence on morphine in mice. *Naunyn Schimiedebergs Archives of Pharmacology* 297: 53-60.
- File SE, Fernandes C (1994). Dizocilpine prevents the development of tolerance to the sedative effects of diazepam in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 47: 823-826.
- Fuchs RA, Evans KA, Parker MC, See RE (2004). Differential involvement of the core and shell subregions of the nucleus accumbens in conditioned cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 176: 459–465.
- Gallimberti L, Canton G, Gentile N, Ferri M, Cibir M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL (1989). Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Lancet* 2(8666):787-789.

- Gallimberti L, Ferri M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL (1992). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double-blind study. *Alcohol Clin Exp Res* 16 (4): 673-676.
- Gallimberti L, Cibir M, Pagnin P, Sabbion R, Pani PP, Pirastu R, Ferrara SD, Gessa GL (1993). Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology* 9(1):77-81.
- Gallimberti L, Schifano F, Forza G, Miconi L, Ferrara SD (1994). Clinical efficacy of gamma-hydroxybutyric acid in treatment of opiate withdrawal. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 244 (3): 113-114.
- Gallimberti L, Spella M, Soncini C, Gessa G (2000). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol and heroin dependence. *Alcohol* 20 (3): 257-262.
- Galloway GP, Frederick SL, Staggars FE, Gonzalez M, Stalcup SA, Smith DE (1997). Gamma-Hydroxybutyrate: an emerging drug of abuse that causes physical dependence. *Addiction*, 92 (1): 89-96.
- Gellert VF y Holtzman SG (1978). Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 536-546.
- Gerra G, Zaimovic A, Raggi MA, Giusti F, Delsignore R, Bertacca S, Brambilla F (2001). Aggressive responding of male heroin addicts under methadone treatment: psychometric and neuroendocrine correlates. *Drug Alcohol Depend* 65(1):85-95.

Referencias bibliográficas

- Gerra G, Zaimovic A, Moi G, Bussandri M, Bubici C, Mossini M, Raggi MA, Brambilla F (2004). Aggressive responding in abstinent heroin addicts: neuroendocrine and personality correlates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28(1):129-39.
- Gerrits MA, Ramsey NF, Wolterink G, van Ree JM (1994). Lack of evidence for an involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in the initiation of heroin self-administration in the rat. *Psychopharmacology* 114: 486-494.
- Gessa GL, Vargiu L, Cabrai F, Boero GC, Caboni F, Camba R (1966). Selective increase of brain dopamine induced by γ -hydroxybutyrate. *Life Sci* 5:1921-1930.
- Gianutsos G, Hynes MD, Drawbaugh RB, Lal H (1975). Paradoxical absence of aggression during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Psychopharmacologia* 43(1):43-6.
- Gianutsos G, Lal H (1978). Narcotic analgesics and aggression. *Mod Probl Pharmacopsychiatry*. 13:114-38. Review.
- Gobaille S, Schmidt C, Cupo A, Herbrecht F, Maitre M (1994). Characterization of methionine-enkephalin release in the rat striatum by in vivo dialysis: effects of gamma-hydroxybutyrate on cellular and extracellular methionine-enkephalin levels. *Neuroscience* 60:637– 48.
- Goldberg SR, Woods JH y Schuster CR (1971). Nalorphine-induced changes in morphine self-administration in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 176:464-471.
- Haney M y Miczek KA (1989). Morphine effects on maternal aggression, pup care and analgesia in mice. *Psychopharmacology* 98: 68-74.

- Haney M y Miczek K.A (1994). Ultrasound emitted by female rats during agonistic interactions effects of morphine and naltrexone. *Psychopharmacology* 114: 441-448.
- Harris GC y Aston-Jones G (2003). Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharma* 28: 73-76.
- Hechler V, Gobaille S, Maitre M (1992). Selective distribution pattern of gamma-hydroxybutyrate receptors in the rat forebrain and midbrain as revealed by quantitative autoradiography. *Brain Res* 572(1-2):345-8.
- Hemby SE, Smith HE, Dworkin SI (1996). The effects of eticlopride and naltrexone on responding maintained by food, cocaine, heroin and cocaine/heroin combinations in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1247-1258.
- Higgins GA, Nguyen P y Sellers EM (1992). The NMDA antagonist dizocilpine (MK-801) attenuates motivational as well as somatic aspects of naloxone precipitated opioid withdrawal. *Life Sci* 50: 167-172.
- Hong M, Milne B, Jhamandas K (1993). Evidence for the involvement of excitatory amino acid pathways in the development of precipitated withdrawal from acute and chronic morphine: an in vivo voltammetric study in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 623:131-41.
- Itzhak Y, Martin JL (2002). Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* 26: 130-34.

- Itzhak Y, Ali SF (2002). Repeated administration of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) to mice: assessment of the sedative and rewarding effects of GHB. *Ann N Y Acad Sci* 965: 451-460.
- Khanna JM, Kalant H, Shah G, Chau A (1993). Effect of D-xycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 983-986.
- Kantak KM, Miczek KA (1986). Aggression during morphine withdrawal: effects of method of withdrawal, fighting experience, and social role. *Psychopharmacology (Berlin)* 90(4):451-6.
- Kantak KM, Miczek KA (1988). Social, motor, and autonomic signs of morphine withdrawal: differential sensitivities to catecholaminergic drugs in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 96(4):468-76.
- Karler R, Calder LD, Bedingfield JB (1994). Cocaine behavioral sensitization and the excitatory amino acids. *Psychopharmacology (Berl)*. 115(3):305-10.
- Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, van der Putten H, Mosbacher J, Bräuner-Osborne H, Waldmeier P, Bettler B (2003). Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA (B) (1)-deficient mice. *Eur J Neurosci* 18(10): 2722-2730.
- Kim HS, Jang CG, Park WK (1996). Inhibition by MK-801 of morphine-induced conditioned place preference and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 55:11-7.

- Kinsley CH y Bridges R (1986). Opiate involvement in postpartum aggression in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 25: 1007-1011.
- Kogan JF y Aghajanian GK (1995). Long-term glutamate desensitisation in locus coeruleus neurons and its role in opiate withdrawal. *Brain Res* 689(1):111-21.
- Koob GF, Pettit HO, Ettenberg A, Bloom FE (1984). Effects of opiate antagonists and their quaternary derivatives on heroin self-administration in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 229:481-486.
- Koob GF (1987). Neural substrates of opioid tolerance and dependence. In: *Problems of Drug Dependence 1986: Proceedings of the 48th Annual Scientific Meeting, The Committee on Problems of Drug Dependence, Inc. (series title: NIDA Research Monograph, vol.76), (L.S. Harris, Ed.)* pp. 46-52. National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD.
- Koob GF (1995). Animal models of drug addiction. In *Psychopharmacology, The Fourth Generation of Progress*, F.E. Bloom and D.J. Kupfer, eds. (New York: Raven Press), pp. 759-772.
- Koob GF, Le Moal M (2006). Opiates. In: *Neurobiology of Addiction*. pp. 121-159. Academic Press. Elsevier, London.
- Koob,GF, Le Moal, M (2006). Psychostimulants. In: *Neurobiology of Addiction*. pp. 69-109. Academic Press. Elsevier, London.
- Kosten TA, Bombace JC (2000). Prior and delayed applications of dizocilpine or ethanol alter locomotor sensitization to morphine. *Brain Res* 878(1-2):20-31.

Referencias bibliográficas

- Kushner SA, Dewey SL, Kornetsky C (1999). The irreversible gamma-aminobutyric acid (GABA) transaminase inhibitor gamma-vinyl-GABA blocks cocaine self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 797–802.
- Laborit, H (1964). Sodium 4-hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol* 3: 433-452.
- Lal H, O'Brien J, Puri SK (1971). Morphine-withdrawal aggression: sensitization by amphetamines. *Psychopharmacology*. 22(3):217-23.
- Lason W, Przewlocka B, Przewlocki R (1983). The effect of gamma-hydroxybutyrate and anticonvulsants on opioid content in the rat brain. *Life Sci* 33:599– 602.
- Lê AD, Quan B, Juzystch W, Fletcher PJ, Joharchi N, Shaham Y (1998). Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology* 135: 169-174.
- Li Y, White FJ, Wolf M (2000). Pharmacological reversal of behavioral and cellular indices of cocaine sensitization in the rat. *Psychopharmacology* 151:175-183.
- Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, Beck P, Froestl W, Kaupmann K, Bettler B, Mosbacher J (1999). Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* 38(11): 1667-1673.
- Lyness WH, Friedle NM, Moore KE (1979). Destruction of dopaminergic nerve terminals in nucleus accumbens: Effect on d-amphetamine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 11: 553-556.

- Maitre M (1997). The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* 51(3):337-61.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 121(1-2):189-97.
- Martellotta MC, Fattore L, Cossu G, Fratta W (1997). Rewarding properties of gamma-hydroxytyuric acid: an evaluation through place preference paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 32: 1-5.
- Mao J (1999). NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res Rev* 30: 289-304.
- McFarland K, Davidge SB, Lapish CC y Kalivas PW (2004). Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci* 24: 1551–1560.
- McFarland K y Kalivas PW (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 21, pp. 8655–8663.
- Morgenroth VH, Walters JR, Roth RH (1976). Dopaminergic neurons. Alteration in the kinetic properties of tyrosine hydroxylase after cessation of impulse flow. *Biochem Pharmacol* 25: 655-661.

Referencias bibliográficas

- Mueller D y Stewart J (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res* 115: 39-47.
- Nestler EJ (1996). Under siege: the brain on opiates. *Neuron* 16:897–900.
- Nestler EJ (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47: 24-32.
- Nissbrant H, Elverfors A, Engberg G (1994). Pharmacologically induced cessation of burst activity in nigral dopamine neurons: significance for the vterminal dopamine efflux. *Synapse* 17(4): 217-224.
- Parker LA y McDonald RV (2000). Reinstatement of both a conditioned place preference and a conditioned place aversion with drug primes. *Pharmacol Biochem Behav* 66(3):559-61.
- Pierce RC y Kalivas KW (1997). A circuitry model of the expresión of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25: 192-216.
- Popik P y Danysz W (1997). Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, Memantine. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 854-865
- Popik P y Skolnick P (1996). The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 1033-1042.

- Popik P, Kozela E, Wrobel M, Wozniak KM, Slusher BS (2003). Morphine tolerance and reward but not expression of morphine dependence are inhibited by the selective glutamate carboxypeptidase II (GCP II, NAALADase) inhibitor, 2-PMPA. *Neuropsychopharmacology* 28(3):457-67.
- Poshivalov VP y Khodko S (1984). Mathematical description and experimental pharmaco-ethological analysis of animal intraspecific agonistic behavior. In: *Ethopharmacological Aggression Research*, Miczek KA, Kruk MR, Olivier B (editors): New York: Alan RL Liss.
- Pudiak CM y Bozarth MA (1993). L-NAME and MK-801 attenuate sensitization to the locomotor-stimulating effect of cocaine. *Life Sci* 53: 1517-1524.
- Pulvirenti L y Koob GF (1994). Dopamine receptor agonists, partial agonists and psychostimulant addiction. *Trends Pharmacol Sci* 15:374–9.
- Raby WN y Coomaraswamy S (2004). Gabapentin reduces cocaine use among addicts from a community clinic sample. *J. Clin. Psychiatry* 65(1): 84-6.
- Ranaldi R, Munn E, Neklesa T, Wise RA (2000). Morphine and amphetamine sensitization in rats demonstrated under moderate- and high-dose NMDA receptor blockade with MK-801 (dizocilpine). *Psychopharmacology* 151(2-3):192-201.
- Rasmussen K, Fuller RW, Stockton ME, Perry KW, Swinford RM, Ornstein PL(1991). NMDA receptor antagonists suppress behaviors but not norepinephrine turnover or locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. *Eur J Pharmacol.* 197(1):9-16.

- Rasmussen K (1995). The role of the locus coeruleus and *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 13:295–300.
- Ratomponirina C, Hode Y, Hechler V, Maitre M (1995). Gamma-Hydroxybutyrate receptor binding in rat brain is inhibited by guanyl nucleotides and pertussis toxin. *Neurosci Lett* 189(1): 51-53.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J. (2003) Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural Plast* 10(4):279-90.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J. (2004) Effects of NMDA receptor antagonists (MK-801 and memantine) on the acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(6):1035-43.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J (2005a). Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. *Brain Res* 1050 (1-2):53-63
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J (2005b). NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res Bull* 64(6):493-503.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J (2005c). Cross-reinstatement by cocaine and amphetamine of morphine-induced place preference in mice. *Behav Pharmacol* 16(4):253-9.

- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Armario A, Minarro J (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology* 185(4):459-70.
- Roberts DC, Corcoran ME, Fibiger HC (1977). On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 6: 615-620.
- Roberts DC S, Koob GF, Klonoff P, Fibiger HC (1980). Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 781-787.
- Roberts DC, Andrews MM, Vickers GJ (1996). Baclofen attenuates the reinforcing effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* 15: 417-423.
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Simon VM (1997). Interaction of morphine and haloperidol on agonistic and motor behaviors of male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 58(1): 153-8.
- Rodríguez-Arias M, Felip CM, Broseta I, Miñarro J (1999). The dopamine D3 antagonist U-99194A maleate increases social behaviors of isolation-induced aggressive male mice. *Psychopharmacology* 144 (1): 90-4.
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J y Simon VM (2001). Development of tolerance to the antiaggressive effects of morphine. *Behav Pharmacol* 12 (3): 221-224.

Referencias bibliográficas

- Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Aguilar M.A, Miñarro J (2002). Memantine does not block antiaggressive effects of morphine in mice. *Behav. Pharmacol.* 13 (3): 249-52.
- Rodríguez-Arias, M, Aguilar, MA, Miñarro, J (2003) The dopamine release inhibitor CGS 10746B blocks conditioned physical signs of morphine withdrawal. *Addict Biol* 8(2): 167-72.
- Roth RH (1970). Formation and regional distribution of gamma-hydroxybutyric acid in rat brain in mammalian brain. *Biochem Pharmacol* 19: 3013-3019.
- Rumigny JF, Cash C, Mandel P, Vincendon G, Maitre M (1981). Evidence that a specific succinic semialdehyde reductase is responsible for gamma-hydroxybutyrate synthesis in brain tissue slices. *FEBS Lett* 134: 96-98.
- Shaham Y, Miczek KA (2003) Reinstatement-toward a model of relapse. *Psychopharmacology* 168: 1-2.
- Sakoori K y Murphy NP (2005). Maintenance of conditioned place preferences and aversion in C57BL6 mice: effects of repeated and drug state testing. *Behav Brain Res* 160: 34-43.
- Satoh M, Zieglansberger W, Herz A (1976). Supersensitivity of cortical neurones of the rat to acetylcholine and l-glutamate following chronic morphine treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 293:101-3.

- Schulteis G, Markou A, Gold LH, Stinus L, Koob GF (1994). Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1391-1398.
- Seidenberg A, Honegger U (2000). *Metadona, heroína y otros opioides*. Granada: Ediciones de Díaz de Santos.
- Sepulveda MJ, Hernandez L, Rada P, Tucci S, Contreras E (1998). Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 60(1):255-62.
- Semenova S, Danysz W, Bernalov A (1999). Low-affinity NMDA receptor channel blockers inhibit acquisition of intravenous morphine self-administration in naive mice. *Eur J Pharmacol* 378:1-8.
- Serra M, Sanna E, Foddi C, Conca A, Biggio G (1991). Failure of gamma-hydroxybutyrate to alter the function of the GABA_A receptor complex in the rat cerebral cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 104 (3): 351-355.
- Shaham Y, Adamson LK, Grocki S, Corrigall WA (1997a). Reinstatement and spontaneous recovery of nicotine-seeking in rats. *Psychopharmacology* 130: 396-403.
- Shalev U, Grimm JW, Shaham Y (2002). Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev* 54: 1-42.

Referencias bibliográficas

- Shippenberg TS, Emmett-Oglesby MW, Ayesta FJ, Herz A (1988). Tolerance and selective cross-tolerance to the motivational effects of opioids. *Psychopharmacology (Berl)* 96(1):110-5.
- Shippenberg T S, Herz A, Spanagel R, Bals-Kubik R, Stin C (1992). Conditioning of opioid reinforcement: Neuroanatomical and neurochemical substrates. *In The Neurobiology of Drug and Alcohol Addiction* (series title: *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 654), (P. W. Kalivas, H.H. Samson, Eds.), pp. 347-356. New York Academy of Sciences, New York.
- Shippenberg TS, Elmer GI (1998). The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit Rev Neurobiol* 12(4):267-303. Review.
- Shoaib M y Storlerman IP (1992). MK-801 attenuates behavioural adaptation to chronic nicotine administration in rats. *Br J Pharmacol* 105: 514-515.
- Schenk S, Valadez A, Worley CM, McNamara C (1993). Blockade of the acquisition of cocaine self-administration by the NMDA antagonist MK-801 (dizocilpine). *Behav Pharmacol.* 4(6):652-659.
- Schmidt-Mutter C, Gobaille S, Muller C, Maitre M (1999). Prodynorphin and proenkephalin mRNA are increased in rat brain after acute and chronic administration of gamma-hydroxybutyrate. *Neurosci Lett* 262: 65 – 8.
- Schroeder R L, Weinger M B, Vakassian L, Koob G F (1991). Methylnaloxonium diffuses out of the rat brain more slowly than naloxone after direct intracerebral injection. *Neurosci Lett* 121: 173-177.

- Smith JE, Guerin GF, Co C, Barr TS, Lane JD (1985). Effects of 6-OHDA lesions of the central medial nucleus accumbens on rat intravenous morphine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 23: 843-849.
- Snead OC, Bearden LJ (1980). Naloxone overcomes the dopaminergic EEG and behavioural effects of g-hydroxybutyrate. *Neurology* 30:832– 8.
- Snead OC, Bearden LJ (1982). The epileptogenic spectrum of opiate agonists. *Neuropharmacology* 21:1137– 44.
- Snead OC (2000). Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor. *J Neurochem* 75(5): 1986-1996.
- Soares BG, Lima MS, Reisser AA y Farrell M. (2001). Dopamine agonists for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev* (CD003352).
- Spano F, Tagliamonte A, Gessa GL (1971). Stimulation of brain dopamine synthesis by gamma-hydroxybutyrate. *J Neurochem* 18: 1831-1836.
- Spyraki C, Fibiger HC, Phillips AG (1983). Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacol* 79: 278-283.
- Stinus L, Nadaud D, Deminiere JM, Jauregui J, Hand TT, Le Moal M (1989). Chronic flupentixol treatment potentiates the reinforcing properties of systemic heroin administration. *Biol Psychiat* (26: 363-371).
- Sukhotina IA, Beshpalov AY (2000). Effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and MRZ 2/579 on morphine withdrawal-facilitated aggression in mice. *Psychopharmacology* 149:345–50.

Referencias bibliográficas

- Tarabar AF, Nelson LS (2004). The gamma-Hydroxybutyrate withdrawal syndrome. *Toxicol Rev* 23(1): 45-49.
- Teter CJ y Guthrie SK (2001). A comprehensive review of MDMA and GHB: two common club drugs. *Pharmacotherapy* 21: 1486-1513.
- Tidey JW, Miczek KA (1992). Heightened aggressive behavior during morphine withdrawal: effects of d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 107(2-3):297-302.
- Tidey JW, Miczek KA (1992). Morphine withdrawal aggression: modification with D1 and D2 receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl)* 108(1-2):177-84.
- Trujillo KA, Akil H (1991) Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251:85-7.
- Trujillo KA, Akil H. (1994). Inhibition of opiate tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Brain Res* 633(1-2):178-88.
- Trujillo KA (2000). Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioural plasticity? *Psychopharmacology* 151:121.
- Trujillo KA (2003). The role of NMDA receptors in opiate tolerance, sensitisation, and physical dependence. En *Glutamate and Addiction*. Herman BH (ed) Humana Press, Totowa, New jersey. Pp: 225-322.
- Tzschentke TM, Schmidt WJ (1997). Interactions of MK-801 and GYKI 52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioral sensitization. *Behav Brain Res* 84:99-107.

- Vaccarino FJ, Pettit HO, Bloom FE, Koob GF (1985a). Blockade of nucleus accumbens opiate receptors, attenuates intravenous heroin reward in the rat. *Psychopharmacology* 86:37-42.
- Vaccarino FJ, Pettit HO, Bloom FE, Koob GF (1985b). Effects of intracerebroventricular administration of methyl naloxonium chloride on heroin self-administration in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 23:495-498.
- Van Dyke C, Byck R (1982). Cocaine. *Sci Am* 246(3):128-41.
- Van Ree JM, Gerrits M A, Vanderschuren LJ (1999). Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol Rev* 51: 341-396.
- Vayer P, Mandel P, Maitre M (1987). Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* 41:1547– 57.
- Vayer P, Maitre M (1989). g-Hydroxybutyrate stimulation of the formation of cyclic GMP and inositol phosphates in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 52:1382– 7.
- Weeks JR y Collins RJ (1976). Changes in morphine self-administration in rats induced by prostaglandin E1 and naloxone. *Prostaglandins* 12: 11-19.
- White FJ y Kalivas PW (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 51: 141-153.

Referencias bibliográficas

Wolf ME y Khansa MR (1991). Repeated administration of MK-801 produces sensitization to its own locomotor stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine. *Brain Res* 562:164-168.

Wolf ME, Jeziorski M (1993). Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioral sensitization. *Brain Res* 613(2):291-4.

Woolverton WL, Rowlett JK, Winger G, Woods JH, Gerak LR, Grance CP (1999). Evaluation of the reinforcing and discriminative stimulus effects of gamma-hydroxybutyrate in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 54 (2): 137-143.

Agradecimientos

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral, es el fruto del trabajo comenzado hace cinco años en cuya trayectoria diferentes personas han contribuido de una u otra forma, para que hoy, al fin, pueda ver plasmada, en estas páginas, todos esos días de labor investigadora. A todas esas personas quiero dar las gracias, aunque en estas líneas no se pueda recoger toda la gratitud que realmente siento.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. José Miñarro el haber depositado su confianza en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo. Realmente su presencia y estímulo me han dado la fuerza y el impulso necesarios para superar los momentos difíciles y recordar en todo momento mi meta. A él le debo el decidirme a estudiar psicobiología, ya que asistí como alumna a una de sus clases y su simpatía al igual que su don en la oratoria me hicieron mirar con otros ojos el campo de la investigación, de modo que hoy en día no sabría dedicarme a otra cosa con tanta pasión.

Dar las gracias mi directora de tesis, la Dra. Marta Rodríguez no es suficiente por todo cuanto ha hecho por mí y por el modo en que me ha enseñado a realizar cada uno de los pasos conducentes al desarrollo de esta tesis. Ella me ha enseñado a ser metódica, ordenada y ágil en mi trabajo. Me ha contagiado su habilidad para a partir de un esbozo ver realizado un complejo experimento, y lo que es más difícil, entenderlo. Además, es de agradecer su preocupación e interés, a nivel personal, por todo cuanto me ha podido suceder y su apoyo incondicional. Cuando he necesitado ayuda, o simplemente me he sentido sola, siempre he podido contar con una palabra de ánimo por parte de Marta.

Agradecimientos

De la Dra. Asunción Aguilar, siempre he recibido una palabra amiga, un consejo sabio, su ayuda y su apoyo. Es muy grato trabajar con una persona tan amable y simpática. Gracias Sunsi por ser así.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros de viaje por los laboratorios de psicobiología. Las primeras personas que me acogieron y me ayudaron ante los problemas Isolde y Carmen, tienen mi gratitud, porque no dejaron que me rindiera cuando tuve momentos de flaqueza, además de compartir horas de laboratorio, también compartí su amistad, que hasta hoy conservo. Luego llegaron Bruno, Fina, Javi y Manuel, con los que compartí momentos de mucho trabajo, pero siempre regados con un toque de buen humor y amistad. Y las últimas incorporaciones al equipo de investigación, Ana, Isra y Conchín, que aunque no llevo mucho tiempo con ellos, somos tan afines que parece que nos conocemos desde siempre, sólo con una mirada nos basta para entendernos. Los considero mis amigos, y espero y deseo que nuestra amistad se amplíe fuera del despacho y los laboratorios, pa' los restos. Una mención especial a Ferrán, que siempre me hace sonreír y nunca ha dudado en echarme un cable. A todos vosotros, GRACIAS. 😊

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. George Ricaurte y a su equipo de investigación por haberme recibido tan amablemente en su laboratorio. El Dr. Ricaurte, a parte de un gran profesional me ha demostrado a nivel humano ser una excelente persona, que no ha dudado nunca en ayudarme cuando lo he necesitado. He pasado momentos muy felices con ellos, he aprendido muchas nuevas técnicas que me han ayudado a ampliar mis conocimientos y poder con ello completar mi tesis. Me han hecho sentir como una más en su equipo y por ello les estaré siempre muy agradecida.

A parte de todas estas personas que compartieron conmigo horas de laboratorio, mis más allegados también compartieron y sufrieron conmigo cada una de mis experiencias durante el desarrollo de esta tesis.

Mis amigos, siempre han estado ahí, conmigo, animándome en los contratiempos, haciéndome sentir querida y compartiendo conmigo cada instante bueno o malo. Mi agradecimiento a Susana y Jorge, mis queridos amigos de tantos años, con ellos me he refugiado siempre en una burbuja entrañable de tertulias y divagaciones filosóficas llenas del mejor humor. Mis queridas amigas de carrera universitaria, Ana y Luz, con las que tantos momentos he compartido, siguen formando parte de mi vida y las considero ya parte de mi familia. De mi amigo-hermano Luiz, todo pensamiento que se me ocurre está lleno de amor y samba, con él he pasado momentos inolvidables y felices, compartimos para siempre unos lazos invisibles de entrañable amistad. Mi gran amigo Paco, que siempre está conmigo, el eterno soñador y creador de momentos entrañables, gracias por estar ahí, no cambies nunca. Juan y Pepe, mis alegres compañeros de trasiegos mundanos, con ellos he compartido momentos muy cálidos, felices y risas, muchas risas. Y mi amiga Melanie, que aunque reside al otro lado del mundo, vive siempre aquí, en mi corazón.

Para mi familia, no hay palabras sino todo el amor del mundo que mi corazón pueda albergar. Es difícil hablar de cada uno de ellos, pues para mí son un todo, vital e imprescindible. Mi hermana Cruz, tan entrañable y amiga, toda corazón olvidándose de ella misma para vivir por y para los demás, le agradezco ser mi amiga y mi hermana, le agradezco el existir. A mi hermano Richard, le agradezco ser quien es, siempre dispuesto a ayudarme, en la sombra, discreto, pero protector como nadie, lleno de amor sereno, es una suerte tenerte. En cuanto a Michel, es difícil expresar en tan poco espacio lo que significa para mí, compartimos tantas cosas que a veces somos uno, nada sería lo mismo si mi hermano mayor no formara

Agradecimientos

parte de mi vida, si intento resumir al máximo mi sentimiento, es éste: Te quiero. Y mis amados sobrinos: Adrián, inteligente, luchador y responsable, le considero el mejor ejemplo de joven perfecto; Aitor, la persona más noble que he conocido en mi vida, lleno de cariño y sensibilidad, fuerte, valiente, la bondad en persona; Isabel: mi sobrinita, la princesa de todos los cuentos, tímida pero llena de amor. Me siento muy orgullosa de tener unos sobrinos así; los amo.

Mi hijo, Talos, al que adoro, ya no sólo por ser parte de mí, sino porque es una persona increíble. Ha soportado muchos días el que su madre no asistiera a ver sus partidos de fútbol porque tenía que estar trabajando y nunca me lo ha reprochado. Desde muy pequeño, siempre con mucho cariño, me decía: mamá, yo quiero lo mejor para ti. Todo un hombrecito, al que amo por encima de todo. Es mi orgullo, mi vida. Gracias por ser así.

Y las últimas frases de agradecimiento van para mi marido, José, al que conocí en tierras lejanas pero del que intuía su existencia, pues siempre lo soñé, sin si quiera conocerlo. El es mi protector, la persona que me anima y está siempre a mi lado. Ha pasado sueño sólo para acompañarme, mientras yo trabajaba en esta tesis, dándome ánimos, sándwiches, café y mucho amor. Con él se que la felicidad existe, y que la vida (aunque suene a tópico) es bella. Es el padre de mi futuro bebé, mi mejor amigo y el amor de mi vida. Gracias por vivir conmigo la vida.

Pero si a alguien he de dar las gracias por todo cuanto soy y tengo, es a mis padres, que siempre velan por mí y seguro me ven desde el cielo.

