











VNIVERSITAT Ò DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

---

**SECUESTRO DEL ACETALDEHÍDO EN LA  
PREVENCIÓN DE LAS RECAÍDAS EN EL  
ALCOHOLISMO: ESTUDIOS DE EFICACIA  
PRECLÍNICA CON D-PENICILAMINA**

---

TESIS DOCTORAL

Alejandro Orrico Sánchez

Julio 2013





# VNIVERSITAT̄ DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

Los que suscriben, Dra. Ana Polache Vengut, Dr. Luis Granero Maciá, Profesores Titulares de Universidad y Dr. Teodoro Zornoza Sabina, profesor Contratado Doctor del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D. Alejandro Orrico Sánchez que lleva por título: "SECUESTRO DEL ACETALDEHÍDO EN LA PREVENCIÓN DE LAS RECAÍDAS EN EL ALCOHOLISMO: ESTUDIOS DE EFICACIA PRECLÍNICA CON D-PENICILAMINA" ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Valencia, a 22 de Julio de 2013

Fdo.

Dra. Ana Polache Vengut   Dr. Teodoro Zornoza Sabina   Dr. Luis Granero Maciá



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias al Proyecto:

“Terapia combinada con agentes secuestrantes de acetaldehído y antagonistas de los receptores opioides como una nueva intervención terapéutica en el tratamiento farmacológico de las recaídas en la dependencia alcohólica: estudios preclínicos”.  
Financiado por Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD\_021), Ministerio de Sanidad y Política Social.



A Ana, Luís y Tedy



A mi familia

A Marta



*“Nuestro homenaje a todo aquel que, con su esfuerzo y dedicación ha conseguido un avance para la humanidad”*

*Leonardo Da Vinci*

Siempre había oído que lo más difícil de la Tesis Doctoral es la escritura, y lo he podido comprobar en primera persona. Se trata de un periodo en el que tienes que redactar y argumentar de una forma científicamente correcta y a la vez entendible para el público en general todas y cada una de las cosas que has hecho durante los cuatro años anteriores en el laboratorio, y claro, muchas cosas ya ni te acuerdas como las hiciste. Para ello, sólo haces que leer millones de artículos para intentar recabar información e ideas que sustenten tus teorías. Aunque, la verdad, la mayoría de veces te pasas horas delante de la pantalla de tu ordenador esperando ansiosamente que te venga la inspiración, que raras veces llega. Además, ¿sabéis todo el trabajo que cuesta escribir un simple párrafo de la Tesis?. Os explico, primero lees millones de artículos en inglés en busca de la idea adecuada, luego hay que plasmarla en un castellano tan culto que parece que estás en la edad de oro de la literatura española, y cuando ya crees que lo tienes redactado perfectamente, ¡¡pasan a corregirlo tus tres directores!! Así que, sucede lo siguiente: el primero te lo cambia entero, el segundo corrige al primero, y el tercero te dice que lo reescribas que no le gusta. Y así hasta llegar a completar las 250 páginas que tiene mi querida Tesis. Pero finalmente todo llega, y aquí estoy, escribiendo con una mezcla entre alivio y nostalgia las últimas páginas, los agradecimientos de lo que ha sido una bonita etapa de mi vida. Durante estos cuatro años hay tanta gente a la que estoy agradecido y tantos recuerdos y anécdotas que podría contar, que me resulta complicado resumirlo en un par de páginas. Así que, ahora que puedo escribir lo que se me ocurra sin que nadie me vaya a corregir ni poner pegas, lo voy a hacer, y al que le aburra que no lo lea.

A los primeros que quiero agradecerles todo su apoyo incondicional es a mis directores de Tesis, Ana, Luís y Tedy. Todo comenzó hace 5 años, cuando yo acababa de terminar la carrera y no sabía que hacer con mi vida, se me ocurrió pedirle consejo a Ana y Luís, dos de los profesores que me marcaron en mi etapa universitaria. Recuerdo que nos reunimos en el antiguo despacho de Ana, y que junto a ella y Luís, estaba Tedy. Después de explicarme las diferentes salidas profesionales, me dijeron: ¿quieres hacer la Tesis con nosotros?. Ahí comenzó esta andadura. Sinceramente creo que me lo dijeron con la esperanza que respondiera que no, ya que no cumplía con el perfil de estudiante que suele hacer la Tesis, pero cuando dije sí se quedaron temblando. Desde entonces, se han encargado de aconsejarme, guiarme y pulirme tanto en los aspectos científico-académicos como en los cotidianos de la vida. Mil gracias por vuestra ayuda incondicional, por haber tenido inmensa paciencia conmigo y por ser como sois. Poco a poco habéis pasado de ser mis profesores, a mis compañeros y ahora a mis amigos.

En segundo lugar quiero agradecerles todo a mis compis de laboratorio, Lucy, MJ, MiniLuci y MJoe. Sabéis perfectamente que sin toda vuestra ayuda no estaría escribiendo esto ahora mismo. Gracias Lucy, MJ y MJoe por enseñarme a operar, teñir, canular, cortar, usar HPLC, y tantas y tantas otras cosas que me habéis explicado con tanta dedicación, entrega y cariño. Y a ti MiniLuci, mi compañera incondicional tanto de lab como de english, de congresos, cursos...y lo que se tercié. Hemos sido como uña y carne y decirte que he trabajado muy muy a gusto contigo. A todas agradeceros las cenas, comidas, bodas, cumpleaños, congresos, cafés y más cafés, etc. y deciros que con vosotras el trabajo se convierte en diversión.

A todos los miembros del Departamento, personal del Animalario, a Marina y Clara, a Mamen por su colaboración durante todos estos años. Gracias de corazón.

A Don Enrique y a todos mis compis de la farmacia por darme la oportunidad de trabajar y ofrecerme siempre facilidades.

A mi madre, por ser el reflejo de palabras como: amor, cariño, dulzura, comprensión, alegría, fortaleza, sacrificio... y tantas otras que me faltarían folios. Gracias por dar tu vida por y para nosotros.

A mi padre, de él he aprendido la responsabilidad, el esfuerzo, el sacrificio diario y la entrega incansable en el trabajo para salir a delante siempre.

A todos y cada uno de mis hermanos y hermanas. Por ser los mejores, porque somos una piña y es lo más bonito y valioso que tenemos. Gracias por ofrecerme vuestro tiempo y vuestro apoyo incondicional como cada uno ha podido, ya sea con gráficas, powerpoints, páginas Excel o simplemente por estar ahí y darme vuestra fuerza. Sobretudo a ti David, porque siempre estás dispuesto a ayudar sea la hora que sea. También a mis cuñad@s por supuesto.

A mi tía Tere, por ser otro pilar importantísimo en mi vida y desvivirse día a día por todos y cada uno de nosotros.

A mi abuela Carmen, por rezar cada día por sus nietos y querernos de todo corazón. También por los abuelos que ya no están, esta Tesis os la dedico de todo corazón.

A mi tío Blas, probablemente la persona que me introdujo en el mundo de la ciencia. Gracias por tu tiempo, tus explicaciones magistrales y los buenos momentos juntos.

Al resto de mi gran familia, tíos, primos, etc. En especial, a mi cousin Quique; por hacerme reír día a día y enseñarme a ser un "bienque", pero sobretudo, gracias por ser mi primo, amigo y hermano.

A todos y cada uno de mis amig@s, amig@s de mis hermanos y de la family. Gracias por cada buen consejo o por las palabras de ánimo que me habéis ofrecido. En especial, a mi gran amigo Juanele, por ser casi como mi novia, por escucharme y aconsejarme en todo, por las "comentaetas", por todo lo vivido juntos y por lo que nos queda.

Y por supuesto a mi querida Marti, porque ya sabes que conocerte ha sido lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias por aguantarme día a día, por estar ahí, por comprenderme, acompañarme domingos y festivos al lab, escucharme hablar de ratas, cerebros y adicciones, darme la paciencia y tranquilidad que no tengo y tantas cosas más que tú ya sabes.





# ÍNDICE GENERAL

## ABREVIATURAS

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
2.1	Alcoholismo: dimensión y problema	7
2.2	Tratamiento del alcoholismo: el problema de las recaídas	10
2.3	Recaídas: definición y medidas	12
2.4	Arsenal terapéutico existente	15
2.4.1	<i>Acamprosato</i>	16
2.4.2	<i>Antagonistas opioides: Naltrexona y Nalmefeno</i>	18
2.5	Desarrollo de nuevos fármacos antirecaída: una necesidad terapéutica	23
2.6	Modelos experimentales para evaluar la eficacia anti-recaída de sustancias en el ámbito de la drogadicción	24
2.7	Estrategias terapéuticas en evaluación para el tratamiento de la recaída	27
2.8	Efectos psicofarmacológicos del etanol sobre el SMCL: el papel de sus metabolitos	30
2.8.1	<i>Metabolismo cerebral del etanol</i>	31
2.8.2	<i>Efectos neurobiológicos del ACD sobre la funcionalidad del SMCL</i>	34
2.8.3	<i>Efectos de la modulación del metabolismo cerebral del etanol sobre sus efectos en el SMCL: participación del acetaldehído</i>	36
2.8.4	<i>Secuestro o inactivación química del ACD y modulación de los efectos del etanol sobre el SMCL</i>	38

2.8.5	<i>Implicación del sistema opioide endógeno en los efectos estimulantes motores del etanol.....</i>	41
2.8.6	<i>El “secuestro” del ACD por aminoácidos azufrados: una estrategia de tratamiento complementaria.....</i>	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1	Compuestos ensayados y soluciones de trabajo.....	51
4.2	Animal de experimentación.....	53
4.3	Protocolo de alcoholización a largo plazo con fases repetidas de abstinencia. ....	54
4.4	Procedimientos de trabajo y métodos quirúrgicos:.....	59
4.4.1	<i>Mini-bomba osmótica Alzet®: preparación y llenado. ....</i>	<i>59</i>
4.4.2	<i>Implantación quirúrgica de la bomba osmótica.....</i>	<i>61</i>
4.4.3	<i>Implantación extereotáxica de la cánula de administración en VTA-p.....</i>	<i>64</i>
4.4.4	<i>Implantación de cánula en la vena yugular y toma de muestras.....</i>	<i>68</i>
4.5	Experimentos. Diseño experimental.....	72
4.5.1	<i>Experimento 1: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica por vía subcutánea.....</i>	<i>72</i>
4.5.2	<i>Experimento 2: Influencia de la DP (1000 µg/h) sobre la preferencia por una solución azucarada.....</i>	<i>74</i>
4.5.3	<i>Experimento 3: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración intra-VTA-p.....</i>	<i>77</i>
4.5.3.1	Validación histológica.....	79

4.5.4	<i>Experimento 4: Niveles de DP en plasma y tejido cerebral y eficacia antirecaída.....</i>	80
4.5.5	<i>Experimento 5: Evaluación de la eficacia antirecaída de una terapia combinada de DP y NTX.....</i>	83
4.5.6	<i>Experimento 6: Determinación de los parámetros farmacocinéticos básicos de la DP en diferentes poblaciones de rata.....</i>	85
4.5.6.1	<i>Protocolo experimental.....</i>	85
4.5.6.2	<i>Métodos farmacocinéticos.....</i>	88
4.6	<i>Valoración de la DP en muestras biológicas.....</i>	90
4.6.1	<i>Solución estabilizadora de DP.....</i>	90
4.6.2	<i>Preparación y toma de muestras.....</i>	91
4.6.3	<i>Condiciones cromatográficas.....</i>	93
4.6.4	<i>Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión.....</i>	95
4.7	<i>Expresión de resultados y análisis estadístico.....</i>	96
4.7.1	<i>Caracterización del protocolo de alcoholización a largo plazo con fases repetidas de abstinencia.....</i>	96
4.7.2	<i>Experimentos 1, 3 y 5.....</i>	98
4.7.3	<i>Experimento 2.....</i>	99
4.7.4	<i>Experimento 4.....</i>	100
4.7.5	<i>Experimento 6.....</i>	100
4.7.6	<i>Métodos matemáticos y estadísticos: programas informáticos empleados.....</i>	101
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>103</b>
5.1	<i>Caracterización del modelo experimental empleado: protocolo de alcoholización a largo plazo con fases repetidas de abstinencia.....</i>	105
5.2	<i>Experimento 1: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica por vía subcutánea.....</i>	117

5.3 Experimento 2: Influencia de la DP (1000 µg/h) sobre la preferencia por una solución azucarada.....	124
5.4 Experimento 3: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración intra-VTA-p.....	126
5.5 Experimento 4: Niveles de DP en plasma y en tejido cerebral y eficacia antirecaída.....	142
5.6 Experimento 5: Evaluación de la eficacia antirecaída de una terapia combinada de DP y naltrexona.....	146
5.7 Experimento 6: Determinación de los parámetros farmacocinéticos básicos de la DP en diferentes poblaciones de rata.....	152
<b>6 DISCUSIÓN .....</b>	<b>177</b>
6.1 Caracterización del modelo experimental empleado.....	179
6.2 Eficacia de la DP en la prevención del ADE.....	188
6.3 Eficacia preventiva de la combinación de NTX/DP.....	197
6.4 Relación niveles plasmáticos/eficacia preventiva y parámetros farmacocinéticos básicos de la DP. ....	201
6.4.1 Relación niveles plasmáticos/eficacia preventiva del ADE.....	202
6.4.2 Linealidad cinética y parámetros farmacocinéticos básicos de la DP en la rata.....	206
6.4.3 Consumo crónico de alcohol y disposición de la DP.....	210
6.4.4 Edad y disposición de la DP.....	211
<b>7 CONCLUSIONES .....</b>	<b>215</b>
<b>8 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>219</b>





# ABREVIATURAS

<b>ACD</b> , acetaldehído	<b>Neuronas GABA</b> , neuronas que liberan GABA
<b>aCSF</b> , fluido cerebroespinal artificial	<b>Neuronas Glu</b> , neuronas que liberan glutamato
<b>ADE</b> , alcohol deprivation effect	<b>NTX</b> , naltrexona
<b>ADH</b> , alcohol deshidrogenasa	<b>PFC</b> , corteza prefrontal
<b>ALDH</b> , aldehído deshidrogenasa	<b>Sal</b> , salsolinol
<b>β-FNA</b> , β-Funaltrexamina	<b>SMCL</b> , sistema mesocorticolímbico
<b>CAT</b> , catalasa	<b>SNC</b> , sistema nervioso central
<b>CPP</b> , condicionamiento de preferencia de lugar	<b>SNpr</b> , Substancia nigra pars reticulata
<b>CYP2E1</b> , citocromo P4502E1	<b>THIQs</b> , tetrahidroisoquinolinas
<b>DP</b> , D-Penicilamina	<b>VTA</b> , área tegmental ventral
<b>EMA</b> , european medicine agency	<b>VTA-p</b> , área tegmental ventral posterior
<b>ETOH</b> , etanol	
<b>FDA</b> , food and drug administration	
<b>GGT</b> , gama glutamil transpeptidasa	
<b>HPLC</b> , cromatografía líquida de alta eficacia	
<b>i.p.</b> , intraperitoneal	
<b>KO</b> , knockout	
<b>MORs</b> , receptores opioides de tipo mu (μ)	
<b>NAc</b> , núcleo accumbens	
<b>NArc</b> , núcleo arqueado	
<b>Neuronas DA</b> , neuronas que liberan dopamina	



# 1 INTRODUCCIÓN



La Organización Mundial de la Salud sitúa al alcoholismo como una de las patologías más importantes, siendo responsable directa o indirectamente de los elevados costes de la Sanidad en los países industrializados. Su tratamiento a día de hoy es claramente insatisfactorio. En él, la actuación psicoterapéutica a través de diferentes estrategias es complementada, en muchos casos, con una intervención farmacoterapéutica basada en el empleo de unos pocos fármacos que intentan solventar el mayor problema a nivel clínico: las recaídas durante los períodos de abstinencia.

Aunque en los últimos años los tratamientos farmacológicos utilizables para la prevención de las recaídas han experimentado un avance importante, todavía distan mucho de arrojar niveles de eficacia adecuados para que podamos considerar resuelto el problema. Actualmente existe un amplio *corpus* de datos experimentales que acredita que el acetaldehído (ACD), el principal metabolito del etanol, juega un papel clave en la activación de las neuronas del sistema mesocorticolímbico (SMCL) tras el consumo de alcohol y que estos efectos activadores son cruciales para el desarrollo de la adicción y las recaídas en los pacientes en tratamiento. Este hecho, ha llevado a proponer a los compuestos como la L-Cisteína y D-Penicilamina (DP), como una prometedora nueva intervención terapéutica en el alcoholismo. Esta propuesta se fundamenta en la creciente evidencia experimental que muestra que estos compuestos, al secuestrar el ACD derivado del etanol, producen su desactivación funcional, siendo así capaces de impedir la activación del SMCL tras el consumo de alcohol. **Sin embargo, a día de hoy, no existen datos sobre su eficacia en la prevención de las recaídas.**

La presente Tesis Doctoral, plantea y evalúa esta nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de las recaídas basada en el uso de agentes secuestrantes del ACD, en concreto la DP. También analiza la eficacia de una combinación, que teóricamente ejercería efectos preventivos aditivos o sinérgicos: la combinación DP con el antagonista de los receptores opioides

## *Introducción*

naltrexona, que actualmente se encuentra en uso en la terapéutica preventiva de las recaídas en el paciente alcohólico. La eficacia preclínica de estas intervenciones farmacoterapéuticas se evaluará a través de estudios utilizando un modelo animal que permite medir el fenómeno ADE, (*Alcohol Deprivation Effect*) cuya validez predictiva para la evaluación de la efectividad antirecaída de agentes farmacológicos está ampliamente demostrada y reconocida. Adicionalmente, y a través de estudios farmacocinéticos, se pretende identificar su concentración mínima eficaz y los parámetros farmacocinéticos básicos de la DP, lo cual permitirá iniciar los estudios para el desarrollo de futuros sistemas farmacéuticos que faciliten su adecuada administración en la prevención de las recaídas.

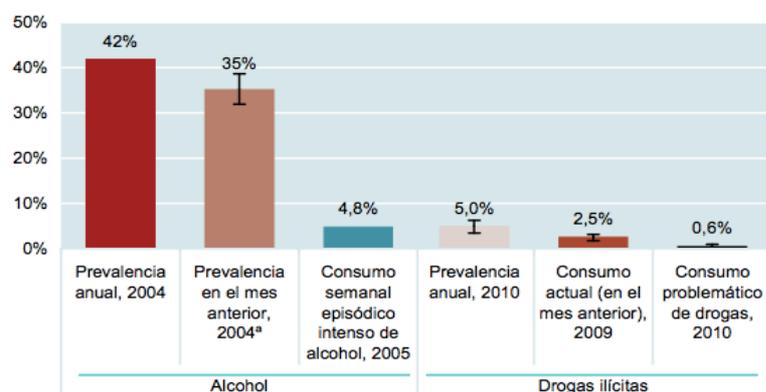
## 2 ANTECEDENTES

## *Antecedentes*

## **2.1 Alcoholismo: dimensión y problema.**

La adicción a las drogas es una enfermedad crónica y recidivante de etiología multifactorial que incluye factores genéticos, neurobiológicos, psicológicos y ambientales (Jupp y col., 2010; Koob y col., 2006). A partir de los datos obtenidos de un estudio acerca del consumo de drogas en la población española de edad comprendida entre 15 y 64 años, se desprende que es el consumo de alcohol uno de los que presenta una mayor prevalencia (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013). Estudios a nivel mundial arrojan resultados parecidos (World Health Organization, 2011). Según el último informe emitido por la UNODC (United Nation Office on Drug and Crime, World Drug Report, 2012), las estimaciones mundiales indican que la prevalencia anual del consumo de alcohol es del 42% (recuérdese que el consumo de alcohol es legal en la mayoría de los países), cifra que es ocho veces superior a la prevalencia anual del consumo de drogas ilícitas, la cual se sitúa aproximadamente en un 5,0% (ver Figura 2.1). Además, la prevalencia del consumo semanal episódico intenso de alcohol (4,8%) es ocho veces superior al consumo problemático de drogas ilícitas (0,6%).

## Antecedentes



**Figura 2.1.** Consumo de alcohol y de drogas ilícitas (expresado en porcentaje) en varias poblaciones de jóvenes y adultos. Fuente: Estimaciones relativas a las drogas ilícitas basadas en datos del cuestionario para los informes anuales de la UNODC; estadísticas relativas al alcohol: Organización Mundial de la Salud, *Global Status Report on Alcohol and Health* (Ginebra, 2011) y *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks* (Ginebra, 2009).

En la Unión Europea, el alcoholismo (en esta Memoria se equiparará este término tanto a “dependencia alcohólica” como a “adicción al alcohol”) también supone, uno de los mayores problemas de salud pública, el cual afecta a cerca de 15 millones de personas (Wittchen y col., 2011). Además, el alcoholismo no es sólo un problema sanitario en sí mismo sino que también lleva asociados multitud de problemas sociales, tales como violencia o absentismo laboral (World Health Organization, 2011), los cuales tienen un elevado coste para nuestra sociedad. Se estima que la prevalencia de las distintas problemáticas asociadas con el alcoholismo se sitúa alrededor del 12-24% en Europa (European Medicine Agency (EMA), 2010). Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, el alcoholismo es el responsable de cerca de 2.5 millones de muertes humanas al año en el planeta. Este organismo en su último informe, emitido en 2011, pone de manifiesto que el consumo de alcohol constituye a nivel mundial el tercer mayor factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades, siendo el factor causal de más de 60 tipos de enfermedades y daños.

## *Antecedentes*

Por último, cabe remarcar que en relación al problema del alcoholismo y su tratamiento, hay que tener en cuenta que, a día de hoy, en muchas sociedades todavía no se reconoce que la dependencia a las drogas en general, y el alcoholismo en particular, es un problema de salud. Por ello, un porcentaje importante de personas enfermas son estigmatizadas y carecen de acceso a los servicios especializados para su tratamiento y atención.

## **2.2 Tratamiento del alcoholismo: el problema de las recaídas.**

El reconocimiento por parte de la clase médica de que el **alcoholismo** es una **enfermedad de naturaleza crónica** supuso un paso crucial para aceptar que es necesario diseñar un abordaje terapéutico para el tratamiento del individuo enfermo. La complejidad del problema, y el desconocimiento más o menos profundo de las alteraciones que se producen a nivel cerebral en los alcohólicos, ha limitado hasta la fecha el desarrollo de estrategias terapéuticas que sean realmente eficaces. Hay que tener en cuenta que el etanol y, en general, las drogas de abuso **generan cambios** no del todo conocidos en determinados sistemas del cerebro **que perduran largo tiempo después de abandonar su uso**. La naturaleza duradera de estos cambios sitúa a los individuos adictos en un estado de elevado riesgo de recaída. De hecho, **el mayor problema a nivel clínico con el que se enfrenta el equipo terapéutico al tratar pacientes alcohol-dependientes ya desintoxicados es la prevención de las recaídas durante los períodos de abstinencia**. Sin intervención terapéutica alguna, se estima que hasta un 85% de los pacientes recaen en el consumo de alcohol (Boothby y col., 2005). Esta situación es común a otras drogas. Así, algunos autores han estimado que las recaídas en el consumo de drogas ocurre en la mayoría de los pacientes, siendo el riesgo de recaída mayor del 60% en el primer año, especialmente durante los 6 primeros meses que siguen al abandono del consumo (McLellan y col., 2000). Así pues, la recaída es una parte fundamental del trastorno adictivo y debe considerarse prioritario el desarrollo de tratamientos preventivos de la misma. De hecho, según una guía editada recientemente por la EMA (*European Medicine Agency, 2010*), “la investigación ha mostrado que el objetivo final en el tratamiento de los pacientes alcohol-dependientes es alcanzar una ABSTINENCIA ESTABLE mediante la prevención de las recaídas tras la desintoxicación”. No obstante, como más adelante se comentará, hoy en día esta misma agencia europea

también considera como un objetivo intermedio válido “lograr una reducción significativa en el consumo de alcohol ocasionada por un agente farmacológico como un primer paso en el camino hacia la abstinencia absoluta”.

Uno de los grandes retos actuales en el campo de la neurobiología de la adicción es comprender la naturaleza y extensión de esos cambios duraderos que las drogas inducen en el cerebro y que hacen muy probable el fenómeno de la recaída. De hecho, muchos esfuerzos se han centrado en la investigación de los procesos neurobiológicos que sustentan la adicción al etanol y la recaída, cristalizando en un mayor conocimiento a nivel neurobiológico de este fenómeno. A pesar de ello, actualmente **existen muy pocos tratamientos antirecaída aprobados y su efecto es limitado** (Bergmark, 2008; Kranzler y col., 2001; Spanagel, 2009).

En consecuencia, podemos afirmar que en la actualidad en el ámbito clínico existe un amplio consenso sobre la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos fármaco-terapéuticos para la prevención de las recaídas en el alcoholismo (Addolorato y col., 2012) que mejoren la tasa de éxito de los actualmente disponibles.

### **2.3 Recaídas: definición y medidas.**

Puesto que la **recaída** constituye el **problema fundamental a tratar** en un paciente alcohólico desintoxicado, consideramos que es básico tratar de definir lo que se entiende por “recaída” así como las maneras que existen actualmente de cuantificarla.

**La recaída puede ser definida como la reanudación de la ingesta de alcohol después de un período prolongado de abstinencia** (Becker, 2009). Algunos expertos en la materia diferencian entre recaída (*relapse*) y lo que podemos denominar como “desliz” (*lapse* o *slip*) que se utiliza para describir una ocasión aislada de consumo de alcohol dentro del periodo de abstinencia (European Medicine Agency (EMA), 2010). La recaída así definida parece implicar que el objetivo terapéutico al instaurar un tratamiento antirecaída durante la deshabitación es evitar que el paciente vuelva a consumir alcohol, es decir, que se mantenga completamente abstinentes. Su medición, en estos términos, es clara: tasa de abstinencia continuada (Tabla 2.1). No obstante, la EMA de acuerdo con las investigaciones clínicas de los últimos años, indica que en aquellos pacientes que **no son capaces** o **no están dispuestos** a mantener la abstinencia absoluta, una **reducción de la ingesta de alcohol** (medida según los criterios mostrados en la Tabla 2.1) es un objetivo intermedio válido.

MÉTODO DE MEDIDA DE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS		
OBJETIVO		
	ABSTINENCIA CONTINUADA (Prevención de la recaída <b>tras desintoxicación</b> )	REDUCCIÓN DEL CONSUMO DE ETANOL (Moderación significativa <b>sin desintoxicación previa</b> )
Criterios principales	Tasa de abstinencia continuada al final del tratamiento Tasa de abstinencia continuada al final del estudio En caso de "desliz": - Reducción en el consumo de alcohol - Reducción del número de días de ingesta alta o muy alta de alcohol - Aumento del número de días de abstinencia	Cambio en el consumo basal de etanol Reducción del número de días de ingesta alta o muy alta de alcohol
Criterios secundarios	Tiempo hasta la recaída (1ª bebida) Mejora del CGI** Mejora del SF 36* Cambio en los biomarcadores hepáticos	Mejora del CGI** Mejora del SF 36* Cambio en los biomarcadores hepáticos

**Tabla 2.1.** Método de medida de la eficacia de los tratamientos farmacológicos para el alcoholismo según el objetivo a alcanzar. \*El cuestionario SF-36 es uno de los instrumentos de Calidad de Vida Relacionada con la Salud (CVRS) más utilizados y evaluados. \*\*CGI (*Clinical Global Impression*) es una escala que mide del 1 al 7 el grado de una enfermedad mental; siendo 1 (normal, no enfermo), 2 (en el límite), 3 (medio), 4 (moderado), 5 (marcado), 6 (severo), 7 (extremo).

Este último enfoque se ha convertido en algo completamente racional desde el punto de vista terapéutico ya que existe una clara necesidad médica para este grupo de pacientes en los que el objetivo de la abstinencia continuada no es viable (European Medicine Agency (EMA), 2010; Mann y col., 2013). Siguiendo esta línea estratégica, ha aparecido muy recientemente un nuevo agente farmacológico, el **nalmefeno**, que está dirigido, no a evitar la recaída en términos absolutos, sino a reducir el consumo excesivo de alcohol en grandes bebedores. En este tipo de pacientes que presentan un consumo tipo alto o muy alto de alcohol (en la Tabla 2.2 se resumen los criterios de la OMS para definir el "tipo de consumo" en función de los gramos de etanol puro ingeridos al día) se

## Antecedentes

recomienda que el nalmefeno se administre por vía oral y “bajo demanda”, es decir, cuando los pacientes perciban que se van a exponer a situaciones que conllevan un elevado riesgo de comenzar a beber. Por tanto, no se prescribe **el nalmefeno** en régimen de dosificación continuo para evitar que el paciente beba de nuevo, sino que se utiliza **ocasionalmente** para que **beba menos** (European Medicine Agency (EMA), 2013). Este novedoso enfoque terapéutico en el tratamiento del paciente alcohólico parece, en principio, menos ambicioso pero se ha de recordar que la reducción en la ingesta de alcohol disminuye la mortalidad y morbilidad (Rehm y col., 2011) asociada al alcoholismo. Además, dado que algunos pacientes no están dispuestos a asumir una abstinencia total como una meta, especialmente al inicio de los tratamientos de deshabitación, este nuevo enfoque puede ayudarlos a **iniciar** el tratamiento: si un paciente alcohólico está de acuerdo en reducir sustancialmente el consumo, es mejor comprometerlo con esa meta como un objetivo intermedio a la vez que se continúa señalando que es absolutamente necesario dirigir al paciente, tan pronto como esté listo para ello, hacia la abstinencia continuada (European Medicine Agency (EMA), 2010).

CONSUMO DE ALCOHOL	HOMBRES	MUJERES	GRADO DE DEPENDENCIA
BAJO	1 a 40 g	1 a 20 g	BAJA
MEDIO	41 a 60 g	21 a 40 g	MEDIA
ALTO	61 a 100 g	41 a 60 g	ALTA
MUY ALTO	101 + g	61 + g	SEVERA

**Tabla 2.2.** Correlación entre el consumo de alcohol (expresado en gramos de alcohol puro por día) y el riesgo de desarrollar dependencia.

## **2.4 Arsenal terapéutico existente.**

Hasta hace relativamente poco tiempo, el arsenal terapéutico farmacológico disponible para la deshabitación alcohólica tenía como único objetivo terapéutico la abstinencia total. Este hecho marcó su evaluación clínica en los distintos ensayos realizados y, además, frenó la aprobación de nuevos compuestos, por parte de las autoridades sanitarias, para el tratamiento del alcoholismo.

El arsenal disponible inicialmente quedaba restringido a los fármacos aversivos disulfiram y cianamida (Antabus<sup>®</sup> y Colme<sup>®</sup>) que junto con el tratamiento psicoterapéutico constituían los pilares básicos de las actuaciones clínicas. Ambos fármacos actúan como inhibidores de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) que se encarga de biotransformar al principal metabolito del etanol, el acetaldehído (ACD), en acetato. Después de la ingesta de alcohol bajo la presencia de alguno de estos fármacos, la concentración de ACD en la sangre puede ser 5-10 veces más alta que la que se encuentra cuando la misma cantidad de alcohol es metabolizada en ausencia de inhibidores. Como el ACD es una sustancia eminentemente tóxica (causante entre otras cosas de algunos de los síntomas de la "resaca"), su acumulación genera una reacción negativa inmediata y grave tras la ingesta de alcohol, incluyendo enrojecimiento de la piel, ritmo cardíaco acelerado, falta de aliento, náuseas, vómitos, dolor de cabeza intenso, alteración de la visión, confusión mental, etc.

Desde un punto de vista práctico, los fármacos aversivos no son muy eficaces para el tratamiento de las recaídas, ya que los pacientes rápidamente aprenden que los graves efectos secundarios padecidos al consumir alcohol pueden desaparecer si abandonan el tratamiento. Por tanto, este fármaco puede disminuir la ingesta al inicio del tratamiento, pero no es efectivo para reducir el consumo masivo.

## *Antecedentes*

El arsenal terapéutico se incrementó en la década de los 90 del siglo pasado con dos fármacos con mecanismo de acción radicalmente diferente al de los aversivos: la naltrexona (Revia®) y el acamprosato (Campral®). Cabe resaltar que aunque su inclusión supuso un avance importante (como se expondrá a continuación) en el tratamiento de las recaídas, los resultados clínicos fueron (bajo el objetivo de la abstinencia absoluta) y son (bajo un objetivo de reducción del consumo) moderados, lo que impide que se pueda considerar resuelto el problema del tratamiento del alcoholismo.

Estos dos tratamientos farmacológicos antirecaída y el basado en el uso de nalmefeno (Selincro®), el cual estará disponible en un futuro próximo, dirigen su actividad hacia dos sistemas de neurotransmisión claramente involucrados, por los estudios neurobiológicos, en los fenómenos de la recompensa y la recaída: el sistema glutamatérgico (acamprosato) y el sistema opioide (naltrexona y nalmefeno). En lo que sigue describiremos sucintamente las bases farmacológicas en las que se sustenta su uso y resumiremos los datos sobre su eficacia clínica disponibles hasta la fecha.

### **2.4.1 Acamprosato.**

El acamprosato, parece actuar como un antagonista débil de los receptores NMDA para el glutamato, siendo por tanto capaz de modular la neurotransmisión excitatoria mediada por dichos receptores (Cano-Cebrian y col., 2003a; Cano-Cebrian y col., 2003b). Diversos estudios han demostrado que este compuesto actúa atenuando el estado “hiper glutamatérgico” que subyace a la abstinencia tanto en fase aguda como en fase crónica (Bachteler y col., 2005; Spanagel y col., 2005), concretamente a través del bloqueo de los receptores ionotrópicos del glutamato (Littleton, 2007).

Los estudios preclínicos en modelos animales para el alcoholismo han demostrado que el acamprosato: (1) reduce la autoadministración de etanol (Spanagel, 2003; Rainer Spanagel y Sanchis-Segura, 2003), (2) inhibe el desarrollo de preferencia condicionada de lugar para el alcohol en ratas (McGeehan y col., 2003), (3) reduce de forma selectiva la búsqueda de la

droga tras la presentación de estímulos asociados a ella en un modelo de reanudación (Bachteler y col., 2005) y (4) también es capaz de suprimir el fenómeno denominado Alcohol Deprivation Effect (ADE) del que daremos una adecuada descripción más adelante (Heyser y col., 1998; Heyser y col., 2003; Spanagel y col., 1996).

Aunque el acamprosato fue introducido en terapéutica en Europa en 1995, por sus pretendidas acciones *anticraving* y preventiva de las recaídas, no ha resuelto sin embargo el problema de las recaídas. De hecho, ha sido objeto de estudio en varios meta-análisis que indican que su eficacia clínica puede ser considerada como moderada o baja (Berglund y col., 1997; Kranzler y col., 2001; Soyka y col., 2008). Tomando como referencia los datos del último meta-análisis donde se incluyeron cerca de 7000 pacientes (Rosner y col., 2010a), el acamprosato es capaz de reducir la tasa de recaída en el consumo de alcohol en aproximadamente un 14% en relación al placebo e incrementar el periodo de abstinencia en alrededor de un 11%. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la reducción del consumo excesivo de alcohol ni en los biomarcadores hepáticos de consumo (Gama Glutamil Transpeptidasa (GGT)). Los propios autores sugieren que, aunque la eficacia del tratamiento es moderada, se deben de valorar estos resultados como positivos debido a la actual falta de tratamientos antirecaída.

#### **2.4.2 Antagonistas opioides: Naltrexona y Nalmefeno.**

Multitud de estudios neurobiológicos han demostrado que los receptores opioides (fundamentalmente los de tipo  $\mu$ ), juegan un papel crucial en los efectos que ejerce el etanol sobre el sistema mesocorticolímbico (SMCL) (Gianoulakis y col., 1996; Gianoulakis, 1996; Herz, 1997; Sanchez-Catalan, 2011; Sanchis-Segura y col., 2000). En estos estudios, que resumiremos a continuación, se ha podido demostrar que los antagonistas de los receptores opioides son capaces de modular algunas de las respuestas neuroquímicas y conductuales producidas por el etanol, lo que ha conferido el sustento experimental para la inclusión de estas sustancias entre el arsenal terapéutico utilizable para la prevención de las recaídas. De hecho, algunos autores sugieren que estos receptores suponen una diana ideal para la búsqueda de tratamientos antirecaída (para una extensa revisión (Spanagel y col., 2012).

Estudios electrofisiológicos relativamente recientes han demostrado que el bloqueo de los receptores opioides de tipo  $\mu$  (MOR, *Mu Opioid Receptors*) impide que el etanol active las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) (Xiao y col., 2007), hecho éste que diversos estudios conductuales en animales ya habían señalado indirectamente años antes. Por ejemplo, con anterioridad se había demostrado que los antagonistas de estos receptores son capaces de prevenir el desarrollo de preferencia de lugar condicionada para el alcohol (Matsuzawa y col., 2000; Middaugh y col., 2000) o de bloquear la activación motora producida por el etanol (Pastor y col., 2006; Sanchis-Segura y col., 2004).

Las primeras evidencias que mostraban que el bloqueo del receptor opioide  $\mu$  por la **naltrexona (NTX)**, un antagonista de amplio espectro de los receptores opioides (O'Malley y col., 1992; Volpicelli y col., 1992), conducía a la reducción del consumo voluntario de etanol en la rata (Altshuler y col., 1980) fueron, incluso, anteriores a los hallazgos neurofisiológicos y

conductuales antes referidos, y marcaron el punto de partida para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de las recaídas en el campo de la investigación en el alcoholismo. Ya entonces, diversos estudios pre-clínicos habían demostrado que la NTX era capaz de reducir la reanudación inducida por la reexposición al alcohol (Bienkowski y col., 1999a; Le y col., 1999; Liu y col., 2002) aunque era ineficaz para bloquear la reanudación inducida por situaciones estresantes (Le y col., 1999; Liu y col., 2002). Los estudios que midieron el fenómeno ADE fueron, sin embargo, menos consistentes. Por ejemplo, Heyser y Koob encontraron que la NTX fue capaz de suprimir el fenómeno del ADE. Sin embargo, en el segundo día post-abstinencia observaron un incremento significativo en el consumo de etanol (Heyser y col., 2003). Holter y Spanagel, por su parte, observaron que la NTX fue capaz de atenuar el ADE, aunque no detectaron diferencias significativas en la ingesta de alcohol respecto al grupo control (Holter y col., 1999). Por último, Sinclair y col. indicaron que, paradójicamente, la administración continuada de NTX durante la abstinencia podía producir un aumento en el consumo de etanol (Sinclair, 2001).

Desde su aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 se han realizado más de cincuenta análisis clínicos y meta-análisis, algunos relativamente recientes (Roozen y col., 2006; Soyka y col., 2008; Srisurapanont y col., 2005a; Srisurapanont y col., 2005b) que demuestran efectos moderados, aunque significativos, de la NTX en cuanto a la prevención de la recaída en el consumo de alcohol en los pacientes alcohol-dependientes. Sin embargo, algunos de ellos (Srisurapanont y col., 2002; Srisurapanont y col., 2005b) también indican que su efectividad no puede considerarse completamente satisfactoria en todos los pacientes alcohólicos: la NTX redujo muy poco la tasa de recaída frente a placebo cuando no se estratificó la muestra de estudio en función del nivel de ingesta de alcohol antes del tratamiento, aunque sí fue claramente eficaz cuando el grupo considerado se circunscribía a aquellos con un consumo de alcohol alto o muy alto (ver tabla 2.2 para valores de referencia). Por otra parte, existen

## *Antecedentes*

evidencias que sugieren un importante papel de la farmacogenética en la heterogeneidad de la respuesta clínica de la NTX. Esta posibilidad derivó del hecho observado, hace más de una década, de la existencia de una variante funcional en el gen *OPRM1* que codifica el receptor MOR. La frecuencia de esta alteración genética varía entre las poblaciones de diferente ascendencia. El hecho de que esta alteración constituya un factor de riesgo genético para la adicción es controvertido (Arias y col., 2006; Bart y col., 2004; Bart y col., 2005; Bond y col., 1998; Kroslak y col., 2007; Zhang y col., 2005). Sin embargo, diversos ensayos clínicos muestran que dicha modificación genética puede modular la eficacia terapéutica de la NTX e incluso que su eficacia puede estar restringida a aquellos pacientes que presentan la alteración genética en el receptor MOR (Anton y col., 2008; Oslin y col., 2003). Aunque un estudio clínico no pudo replicar estos resultados, cabe comentar que dos estudios de laboratorio en humanos también observaron que la alteración del gen *OPMR1* modula los efectos de la NTX (Ray y col., 2007).

Según la última actualización de la revisión Cochrane (Rosner y col., 2010b) (revisión sistemática que resume los resultados de todos los estudios disponibles que hayan sido cuidadosamente diseñados y que proporciona un alto nivel de evidencia sobre la eficacia de las intervenciones en temas de salud) la NTX es capaz de **reducir el riesgo de recaer en el consumo alto o muy alto** de alcohol al 83% del valor obtenido con el placebo. En otras palabras, este antagonista opioide previene el consumo excesivo de etanol en uno de cada nueve pacientes alcohol-dependientes. Además, la NTX redujo aproximadamente un 4% el **número de días de bebida** (número de días, expresados como porcentaje, en los que el paciente consumió alcohol respecto a todos los días que duró el estudio) en relación al placebo. La NTX fue capaz de reducir también significativamente el **número de días en los**

**que el paciente consumió 5 o más bebidas estándar<sup>1</sup>** así como en la cantidad de alcohol consumido en relación a lo hallado en el grupo tratado con placebo. Ahora bien, estos autores también pusieron de manifiesto que la NTX no redujo significativamente el retorno al consumo de alcohol independientemente de la cantidad consumida, es decir, no mejoró significativamente frente a placebo la abstinencia continuada. Como estos autores concluyen, puede ser que estos antagonistas opioides no supongan una terapia “mágica”, es decir, totalmente efectiva en el alcoholismo. Sin embargo, tal como apuntan muchos autores, es probable que no exista una estrategia única que por sí misma resuelva el problema de la recaída en el alcoholismo debido a la complejidad de los procesos implicados en el desarrollo y mantenimiento de la adicción. A pesar de ello, y debido al escaso arsenal terapéutico actualmente disponible en este ámbito, la NTX puede considerarse como una terapia de efectividad moderada, pero útil.

Como antes señalamos, a principios de 2013, la EMA autorizó la venta y comercialización de un nuevo antagonista opioide que permite la reducción del consumo de alcohol en situaciones de dependencia alcohólica. Se trata del nalmefeno que se comercializará bajo la denominación de Selincro®, aunque no llegará a España hasta 2014. Los estudios preclínicos en ratas alcohol-dependientes demuestran que el nalmefeno es significativamente más eficaz en la supresión de la ingesta de alcohol que la NTX (Walker y col., 2008). En clínica, el nalmefeno está indicado para la reducción del consumo de alcohol en pacientes alcohólicos con un nivel de consumo catalogado de alto riesgo (ver Tabla 2.2: consumo superior a 60 g de alcohol al día en varones y superior a 40 g de alcohol al día en mujeres), que no tengan síntomas físicos de abstinencia y que no requieran una desintoxicación inmediata. Como ya se ha comentado con anterioridad, este

---

<sup>1</sup> Bebida estándar es una bebida teórica que contiene una cantidad especificada de alcohol puro. Este concepto es usado en muchos países para cuantificar la ingesta de alcohol. Las bebidas estándar varían significativamente de un país a otro. Por ejemplo, en Australia equivale a 6 gramos de alcohol, en EEUU a 14 gramos, mientras que en Japón equivale a 19.75 gramos. En España una bebida estándar equivale a 10 gramos de alcohol puro.

### *Antecedentes*

tratamiento no está encaminado a conseguir la supresión total de la ingesta en los pacientes sino a la reducción en el consumo de etanol (Gual y col., 2013; Luquiens y col., 2011) un objetivo totalmente novedoso y admitido como válido para el tratamiento de la adicción al alcohol recientemente por la EMA.

## **2.5 Desarrollo de nuevos fármacos antirecaída: una necesidad terapéutica.**

Atendiendo a los datos mostrados anteriormente, podemos concluir que la eficacia de los tratamientos actualmente disponibles para las recaídas en el alcoholismo puede considerarse moderada o incluso baja (Edwards y col., 2011; Heilig y col., 2011; Leggio y col., 2010). Por ello, se hace necesario el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos para la deshabituación alcohólica que supongan una clara mejoría frente a los actualmente disponibles (Addolorato y col., 2012). Fruto de esta necesidad clínica y de la mejor comprensión de las bases neurobiológicas de la adicción al etanol existen actualmente multitud de compuestos identificados en la investigación básica y que podrían, potencialmente, utilizarse con este fin. Para ello, resulta indispensable disponer de adecuadas herramientas preclínicas que permitan el análisis detallado de la eficacia de posibles candidatos, a ser posible, en un corto periodo de tiempo. La realización de estudios preclínicos reproducibles y potentes asegura un grado de éxito en los estudios clínicos y permite reducir costes económicos y de esfuerzo personal (Skolnick y col., 2012). No obstante, cabe resaltar que no existen, en el ámbito que nos ocupa de la prevención de las recaídas, demasiados modelos preclínicos que permitan este estudio. En lo que sigue intentaremos presentarlos, pues uno de ellos ha sido utilizado para la realización de gran parte de los experimentos que constituyen la presente Tesis Doctoral.

## **2.6 Modelos experimentales para evaluar la eficacia anti-recaída de sustancias en el ámbito de la drogadicción.**

Existen dos grupos de modelos experimentales generales de uso comúnmente aceptado que permiten analizar la eficacia preventiva de las recaídas de posibles candidatos farmacológicos: 1) los llamados modelos de reanudación o “reinstatement” en terminología anglosajona y 2) los modelos que emplean la medición del fenómeno denominado ADE, siglas de “Alcohol Deprivation Effect” en animales con una larga experiencia en consumo de etanol.

### *1) Modelos de reanudación*

Se trata de modelos de autoadministración operante en los que el animal, durante una primera fase llamada de condicionamiento, debe aprender a realizar una determinada tarea, como manipular lo que se denomina un *operando* (por ejemplo, presionar una palanca), para la obtención de la droga. En esta fase de aprendizaje o condicionamiento, la manipulación del operando además de estar asociada a la obtención de la droga está, en ocasiones, asociada a la presentación de un estímulo visual (por ejemplo, una luz) o sonoro (un determinado sonido de una frecuencia específica). Tras alcanzar un consumo estable, debido a una manipulación estable del operando, se suele someter a los animales a una fase de extinción, en la cual la manipulación del operando (por ejemplo, la presión de la palanca) deja de estar asociada a la obtención de la droga y el animal deja de realizar la tarea. Tras la extinción, el experimentador presenta a los animales diferentes situaciones o estímulos que habían estado apareados a la droga durante la fase de condicionamiento y evalúa cuáles de ellos reinstauran la respuesta de manipulación del operando (reanudación), **aún sin la presencia de la droga**. Normalmente se utilizan tres tipos de situaciones o estímulos para reanudar el comportamiento de búsqueda de la droga: pistas o estímulos ambientales (que previamente se habían asociado con la obtención de la droga), la administración de una pequeña dosis de alcohol (*priming*) y

situaciones que inducen estrés (Shaham y col., 2003). La ventaja de estos procedimientos es que el experimentador puede variar la complejidad y el costo de la respuesta que debe realizar el animal para obtener el alcohol. De este modo se puede evaluar el grado de motivación que tiene el animal para buscar el alcohol (Samson y col., 1985). Existen muchos autores que consideran que los modelos de reanudación son un buen indicador de la búsqueda de la droga y recaída en el consumo de alcohol (Rodd y col., 2004; Spanagel, 2003).

Los fármacos antirecaída más utilizados actualmente, el acamprosato y la NTX, son capaces de suprimir la reanudación tras una fase de extinción (Bachteler y col., 2005; Katner y col., 1999), hecho que valida predictivamente a este tipo de modelos.

Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la recaída se puede definir como una vuelta al consumo de alcohol tras un periodo de abstinencia. Por tanto, otros autores consideran la reanudación como un modelo válido para el estudio del comportamiento de búsqueda de la droga (al palanquear tras el periodo de extinción), pero no para el estudio de la recaída, ya que: 1) no existe un periodo de abstinencia propiamente dicho (el animal sigue ejecutando las mismas tareas para conseguir la droga, aunque no lo consiga) y 2) la fase de reanudación se produce sin que el animal vuelva a recibir la droga, por lo que no se producen los efectos psicoactivos asociados con su ingesta (Conklin y col., 2002; Sanchis-Segura y col., 2006; Shaham y col., 2003). Por ello este tipo de modelos carecen de *validez del constructo*, es decir, su semejanza con el comportamiento humano es limitada.

## *Antecedentes*

### *2) Modelos en los que se evalúa el fenómeno ADE*

**El fenómeno ADE (del inglés Alcohol Deprivation Effect) es un incremento temporal en el consumo de alcohol que se produce en el animal de experimentación tras un periodo o periodos de abstinencia forzada.** Fue descrito por primera vez en ratas por Sinclair y Senter en 1967 (Sinclair y col., 1967). Los animales que habían tenido un acceso voluntario al etanol durante un período de tiempo prolongado mostraron un incremento significativo y transitorio en la ingesta de la droga después de un período de privación forzada. Desde este estudio, el ADE ha sido descrito no sólo en rata (Herz, 1997; Holter y col., 1999; McKinzie y col., 2000; Rodd-Henricks y col., 2000; Sinclair y col., 1989) sino también en ratón (Salimov y col., 1993), mono (Kornet, M y col., 1991) y en humanos (Burish y col., 1981). Además, se ha visto que este fenómeno se observa de igual manera tanto en condiciones de libre acceso, como en condiciones de acceso restringido, en modelos de autoadministración operante y en modelos de autoadministración no operante (Martin-Fardon y col., 2013). Algunos autores proponen esta alternativa para el estudio de los aspectos de la recaída que no pueden estudiarse con los modelos de reanudación (Le y col., 2002a).

El acamprosato y la NTX son capaces de reducir/suprimir el ADE (Holter y col., 1999; Sinclair y col., 1973a; Spanagel y col., 2008). **Esta validación farmacológica ha proporcionado validez predictiva al modelo ADE en lo referente a la búsqueda de nuevos y mejores fármacos en el tratamiento de las recaídas.**

Es necesario tener en consideración, sin embargo, que el modelo difiere en determinados aspectos de la situación habitual en humanos. Por ejemplo, se ha criticado que, en estos modelos que miden el ADE, el periodo de abstinencia no está bajo el control del animal. Además, el modelo sólo sirve para caracterizar la vuelta al consumo de alcohol como consecuencia de la re-exposición a la droga y, por tanto, la motivación que, en humanos, antecede a la búsqueda de la droga no es analizada por el modelo.

A pesar de esto, en los últimos años este modelo se ha convertido en un paradigma ampliamente utilizado para el estudio de la eficacia de nuevos fármacos que potencialmente podrían utilizarse en el tratamiento de las recaídas en el consumo de alcohol. Estos estudios han sido revisados y resumidos recientemente por el grupo de Rainer Spanagel, autores con una amplia experiencia en este campo (Spanagel y col., 2008; Spanagel, 2009; Vengeliene y col., 2008). Estas revisiones ponen en evidencia que los procesos que subyacen al fenómeno de recaída parecen incluir los mismos circuitos neuronales en roedores que en humanos, constituyendo los modelos animales una excelente base para el desarrollo de nuevas farmacoterapias. Por tanto, los resultados alcanzados en los estudios pre-clínicos que emplean la medición del ADE, proporcionan una base sólida para el desarrollo posterior de ensayos clínicos controlados.

## **2.7 Estrategias terapéuticas en evaluación para el tratamiento de la recaída.**

El alcohol es una droga que afecta a multitud de circuitos neuronales siendo sus acciones a nivel cerebral sumamente complejas. De hecho se le conoce habitualmente como la “droga sin receptor” y, como ejemplo, en la actualidad no existe una propuesta comúnmente consensuada a nivel científico sobre cómo el etanol afecta la funcionalidad de un sistema cerebral tan importante en el ámbito de la adicción como es el SMCL. Es cierto, sin embargo, que en las últimas décadas se han producido importantes avances no sólo en la comprensión de los circuitos neuronales implicados en la recaída sino también en las alteraciones persistentes que el etanol induce en ellos. Muchos de los compuestos que actualmente se están ensayando como fármacos potenciales para el tratamiento de las recaídas (Tabla 2.3), actúan a nivel de los receptores específicos de los neurotransmisores que, según las investigaciones previamente realizadas, juegan un papel crítico en los procesos de recaída (Litten y col., 2012). Desafortunadamente, el uso de la

## Antecedentes

mayoría de los candidatos más prometedores se ha visto comprometido debido a problemas asociados con sus efectos secundarios (Leggio y col., 2010; Spanagel y col., 2012). Cabe añadir además que, para este tipo de compuestos (agonistas GABA-B, antagonistas y agonistas parciales dopaminérgicos, varios anticonvulsivantes, antagonistas de los receptores NMDA y varios agentes serotoninérgicos), la evidencia clínica que existe es muy limitada o no hay diferencias respecto al placebo (European Medicine Agency (EMA), 2010).

RECEPTORES	COMPUESTOS REPRESENTATIVOS	ESTADO
5-HT3 <sup>a</sup>	Ondansetrón	Preclínicos, Cínicos
5-HT2 <sup>a</sup>	Olanzapina	Preclínicos, Cínicos
Adenosina A2 <sup>a</sup>	DMPX	Preclínicos
Adrenérgicos $\alpha$ 1 <sup>a</sup>	Prazosin	Preclínicos, Cínicos
AMPA, receptor GABA-A <sup>a</sup>	Topiramato	Preclínicos, Cínicos
CRF1	Antalarmin, MTIP, Pexacerfont	Preclínicos, Cínicos
GABA-A	RY 023	Preclínicos
GABA-B <sup>a</sup>	Baclofeno	Preclínicos, Cínicos
GLT1 <sup>a</sup>	Ceftriaxona	Preclínicos
mGluRs	METP	Preclínicos
nAChRs <sup>a</sup>	Varenicicle, CP-601932	Preclínicos, Cínicos
NK1a	LY68017, Aprepitant	Preclínicos, Cínicos
Receptores NMDA <sup>a</sup>	Neramexano, memantina	Preclínicos, Cínicos
Receptores opioides <sup>a</sup>	Nalmefeno, naltrexona	Preclínicos, Cínicos
DOR	SoRI-9409, TAN-67	Preclínicos
KOR	Nor-BNI	Preclínicos
OX1, OX2	SB-334867, JNJ-10397049	Preclínicos
Vasopressin 1b	Nelivaptan (SSR 149415)	Preclínicos

**Tabla 2.3.** Receptores que se ha demostrado que participan en distintos procesos relacionados con el alcoholismo. <sup>a</sup>Compuestos aprobados por la FDA. 5-HT=5-Hydroxytryptamine;ADLH=aldehyde dehydrogenase;AMPA=a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionicacid; CRF=corticotrophin-releasing factor; DOR=d-opioid receptor; GABA=gamma-aminobutyric acid; GLT1=glutamatetransporter1; KOR=k-opioid receptor; mGluR=metabotropic glutamate receptor; nAChR=nicotinic acetylcholine receptors; NK=neurokinin; NMDA=N-methyl-D-aspartate; OX=orexin receptor.

Actualmente, una **estrategia muy prometedora y alternativa al manejo de antagonistas o agonistas específicos de ciertos receptores** para el tratamiento de la adicción a algunas drogas (cocaína, nicotina), es el empleo de **vacunas especialmente diseñadas contra estas drogas** (Shen y col., 2012). Teóricamente, las vacunas, al no interactuar directamente con ningún sistema de neurotransmisión, evitarían los efectos secundarios que sí provocan algunas de las nuevas farmacoterapias. Al contrario, su objetivo es generar anticuerpos específicos que, en presencia de la droga en el torrente circulatorio, se unirían a ella y permitirían reducir la velocidad y la cantidad de droga que accede al cerebro y, consecuentemente, dificultarían la unión de la misma a su receptor específico. De este modo, se impediría que un nuevo contacto ocasional con la droga, tras un periodo de abstinencia, pueda conducir a una nueva recaída, a través de lo que se ha venido en llamar el efecto “priming” (Shen y col., 2012), con la consiguiente escalada en el consumo. Desafortunadamente, esta nueva estrategia no se ha dirigido hacia el desarrollo de vacunas para el alcoholismo, probablemente por las propiedades físico-químicas tan particulares que presenta esta droga.

**Una alternativa**, conceptualmente comparable con la constituida por las vacunas, **podría ser la inactivación química de la droga antes de que ésta pueda interactuar con su receptor/es**. Y, curiosamente, en el caso del etanol esta estrategia de inactivación o “secuestro” se plantea como factible y potencialmente muy interesante **y, precisamente, es la que hemos explorado en esta Tesis**.

Para comprender en qué se basa esta estrategia terapéutica es necesario que revisemos con cierto detalle los hallazgos más recientes en relación con el mecanismo a través del cual el etanol interactúa y altera la funcionalidad del SMCL. Será éste el objetivo de los siguientes epígrafes de estos Antecedentes.

## **2.8 Efectos psicofarmacológicos del etanol sobre el SMCL: el papel de sus metabolitos.**

Algunos autores han planteado que tal vez no sea el etanol, sino otra molécula derivada de su metabolismo, con unas propiedades físico-químicas bastante diferentes, la que produce los efectos psicofarmacológicos de la droga. En este sentido, varios grupos de investigación llevan años aportando multitud de evidencias experimentales (conductuales, neuroquímicas y electrofisiológicas) que sugieren con contundencia que el ACD, el principal metabolito del etanol, juega un papel determinante en algunos de los efectos que ejerce el etanol sobre el SMCL, efectos que son cruciales para el desarrollo de la adicción a esta droga. Aunque se han publicado excelentes revisiones sobre este tema en los últimos años que pueden consultarse para un análisis más detallado (Correa y col., 2012; Deehan y col., 2013; Hipolito y col., 2012), intentaremos a continuación resumir **los principales hallazgos** que avalan esta hipótesis. Dado que el ACD constituye el elemento clave en esta concepción del mecanismo de acción del etanol sobre el SMCL, comenzaremos recordando los aspectos fundamentales relativos al metabolismo del etanol.

### 2.8.1 Metabolismo cerebral del etanol.

Desde la década de 1970, el ACD, primer metabolito del etanol, ha sido postulado como el mediador de cierto número de efectos conductuales relacionados con la activación del SMCL por parte del etanol. Sin embargo, esta hipótesis ha sido motivo de controversia y debate entre los investigadores durante las últimas décadas (Hipolito y col., 2007). Una de las principales causas de este debate fue la demostración de la presencia de ALDH en la microvasculatura del cerebro. Este hecho suponía la existencia de una barrera metabólica altamente eficaz para evitar que el ACD que se forma a nivel sistémico (fundamentalmente en el hígado) y que aparece en el torrente sanguíneo tras la administración de etanol, accediese al cerebro. Por lo tanto, en un primer momento se creyó que el ACD no podría ser un agente mediador de los efectos conductuales del etanol, debido a esta potencial incapacidad para alcanzar el SNC. De hecho, ciertas evidencias experimentales sugerían que para poder pasar la barrera hematoencefálica, el ACD necesitaba alcanzar concentraciones sanguíneas superiores a 100 $\mu$ M (Tabakoff B y col., 1976). Tras la administración aguda de etanol los niveles de ACD en sangre son 10 veces menores a la cantidad antes mencionada, siendo además difícilmente detectables en la mayoría de las ocasiones (Eriksson CJ, 1992). Por tanto, los datos experimentales parecían sugerir que el ACD, generado a nivel periférico, no podía ser el responsable de los efectos del etanol sobre el SMCL.

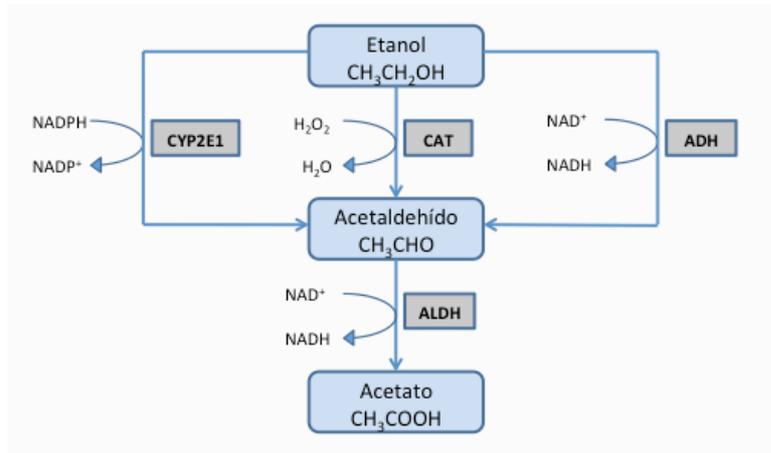
Si, tal como se sigue postulando en la actualidad, el ACD participa en la génesis de algunos de los efectos centrales del etanol, no cabe otra alternativa: se ha de demostrar que su origen es cerebral, es decir, el etanol debe biotransformarse *in situ*, en el cerebro generando allí el ACD. Para ello, la maquinaria enzimática necesaria debe estar presente en el cerebro.

## *Antecedentes*

Aunque la existencia de un metabolismo hepático como parte fundamental de la eliminación del etanol era un hecho bien descrito en la literatura farmacocinética y toxicológica desde los años 50 del siglo pasado (Jacobsen, 1952), no fue hasta principios de los años 70 cuando Raskin y Sokoloff (Raskin NH, 1970) postularon por primera vez que el etanol podía metabolizarse también *in situ* en el cerebro. Esta propuesta se basó en la detección en el cerebro de uno de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo del etanol. Actualmente, como muestra la **Figura 2.2**, se sabe que son tres los sistemas enzimáticos involucrados en la biotransformación del etanol: la alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocromo P4502E1 (CYP2E1) y la catalasa (CAT). Todos ellos participan, en distinta medida, no sólo en el metabolismo hepático del etanol sino, también, en el cerebral.

Desde el hallazgo de Raskin y Sokoloff, la presencia de estos sistemas enzimáticos en el **cerebro** ha sido demostrada en repetidas ocasiones y por diferentes laboratorios. Aunque la contribución exacta de cada uno de ellos no ha sido definitivamente establecida, a día de hoy se puede afirmar que el **metabolismo cerebral del etanol es un fenómeno plenamente demostrado**.

El etanol se metaboliza fundamentalmente por oxidación, transformándose en ACD. En situaciones de consumo oral (las más habituales) este proceso acontece principalmente en el **hígado** y es mediado fundamentalmente por la enzima alcohol deshidrogenasa, ADH. En un segundo paso, el ACD es metabolizado a acetato principalmente por la ALDH.



**Figura 2.2:** Representación gráfica de los mecanismos enzimáticos responsables del metabolismo del etanol.

En el **cerebro**, el mapa enzimático es menos conocido que en el hígado y parece ser un tanto diferente. La ADH realiza una contribución minoritaria al metabolismo cerebral del etanol, tal y como algunos estudios bioquímicos (Zimatkin y col., 2006) y conductuales (Escarabajal y col., 2002) han mostrado. Asimismo, el sistema enzimático CYP2E1 (Bhagwat y col., 1995) es el responsable de aproximadamente el **20%** del metabolismo cerebral del etanol (Zimatkin y col., 2006). Recordemos que a nivel hepático, el CYP2E1 constituye también el segundo sistema en importancia tras la ADH. El tercer sistema enzimático, la **catalasa**, se ha propuesto como el **principal responsable del metabolismo cerebral del etanol**. Este sistema enzimático cataliza la oxidación de etanol a ACD mediante el empleo de peróxido de hidrógeno (Tampier y col., 1986) siendo responsable de aproximadamente el **60%** del metabolismo cerebral del etanol (Zimatkin y col., 2006). Por el contrario, la catalasa no parece tener una gran implicación en el metabolismo de etanol a nivel hepático bajo condiciones fisiológicas, puesto que el pre-tratamiento con inhibidores de la catalasa no produce alteraciones significativas en la farmacocinética sanguínea del etanol (Tampier y col., 1987).

## *Antecedentes*

A día de hoy, la comunidad científica acepta, sin apenas discrepancias, que el ACD, se puede generar en el cerebro tras el consumo de etanol con la participación principal de la catalasa y el CYP2E1, habiéndose demostrado incluso la existencia de estos sistemas enzimáticos en regiones tan cruciales para el desarrollo de los trastornos adictivos como las distintas áreas que componen el SMCL (Aragon y col., 1992; Hipolito y col., 2007; Sanchez-Catalan y col., 2008; Zimatkin y col., 2006).

### **2.8.2 Efectos neurobiológicos del ACD sobre la funcionalidad del SMCL.**

Demostrada la capacidad del cerebro para generar *in situ* ACD a partir del etanol, los esfuerzos de los investigadores se han centrado en demostrar que, el ACD *per se* es capaz de afectar la funcionalidad del SMCL de forma similar a la alteración producida por el etanol (para una revisión reciente ver (Correa y col., 2012).

Numerosos estudios han mostrado que el ACD, inyectado directamente en el cerebro de roedores, es capaz de provocar **respuestas conductuales** similares a las producidas por el etanol, incluyendo estimulación motora (Arizzi-LaFrance y col., 2006; Correa y col., 2003; Correa y col., 2009; Sánchez-Catalán y col., 2009), autoadministración (Brown y col., 1980; Myers y col., 1982; Rodd-Henricks y col., 2002), condicionamiento de preferencia de lugar (Quertemont y col., 2001; Quintanilla y col., 2002; Smith y col., 1984) y aversión condicionada al gusto (Aragon y col., 1986; Brown y col., 1978). De todos estos estudios quisiéramos destacar dos, por su relevancia en el contexto que nos ocupa. El primero fue publicado en 2006 por Arizzi y col. (Arizzi-LaFrance y col., 2006) y en él se identificaba, por primera vez, una región cerebral, la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr), en la que tanto el ACD como el etanol desencadenaban respuestas motoras similares, tras la administración de dosis del mismo orden. El segundo de ellos, demostraba que el ACD inyectado directamente en VTA posterior (VTA-p) generaba una

activación motora indicativa de una clara activación del SMCL (Sanchez-Catalan y col., 2009). Este fenómeno era también producido por el etanol, tal y como Arizzi y col. encontraron en SNpr pero, en este último estudio, se mostraba, además, que los receptores opioides de tipo  $\mu$  (MORs) constituían un elemento esencial en el mecanismo de acción tanto del etanol como del ACD.

Recientemente, también se ha comprobado que las microinyecciones de ACD en otras regiones cerebrales, como el núcleo arqueado del hipotálamo (NArc), aumentan la actividad locomotora de los animales (Correa y col., 2009), al igual que hace el etanol (Pastor y col., 2008).

Como vemos, **la administración localizada de ACD es capaz de desencadenar efectos conductuales, análogos a los producidos por el etanol.** No obstante, este tipo de evidencias, aun siendo importantes, no demuestran que el ACD sea un elemento necesario para la aparición de estos efectos tras la administración de etanol. Para ello, es necesario un enfoque diferente.

Por ejemplo, puede ser mucho más adecuado el uso de una estrategia experimental que permita el bloqueo (o la reducción significativa) de la formación del ACD tras la administración del etanol y analice la aparición, o no, de los efectos conductuales (o de otro tipo) de la droga. Otra aproximación alternativa útil podría consistir en la inactivación química del ACD formado (lo que se ha venido en llamar su “secuestro”) tras la administración del etanol y la comprobación posterior de la aparición, o no, de los efectos propios del etanol. Como se mostrará a continuación, ambas estrategias han sido empleadas por distintos grupos de investigación, entre ellos el nuestro, y los resultados parecen confirmar que **el ACD es un elemento necesario para desencadenar la activación del SMCL**; sin su participación el etanol se muestra incapaz de activar el SMCL.

### **2.8.3 Efectos de la modulación del metabolismo cerebral del etanol sobre sus efectos en el SMCL: participación del acetaldehído.**

La manipulación de la actividad (tanto la inhibición como la promoción) de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo cerebral del etanol ha sido la estrategia más ampliamente utilizada para demostrar la implicación del ACD en la génesis de los efectos del etanol sobre el SMCL. Dada su importancia en el metabolismo cerebral del alcohol, la manipulación de la actividad de la **CATALASA** ha sido la estrategia mayoritariamente utilizada, aunque no la única. En este sentido, y sólo como muestra, citaremos los resultados de tres **estudios conductuales** recientes que utilizan **inhibidores de esta enzima**. En el primero se comprobó que la administración sistémica de **azida sódica** en ratas (tratamiento que fue capaz de disminuir hasta en un 40% la actividad de la catalasa cerebral) previene la estimulación locomotora inducida por la administración intra-SNpr de etanol (Arizzi-LaFrance y col., 2006). Del mismo modo, la administración de **aminotriazol** es capaz de bloquear los efectos estimulantes motores derivados de la administración de etanol en el NArC del hipotálamo de ratas (Pastor y col., 2008). Por último, nuestro grupo ha demostrado recientemente que el bloqueo de la catalasa mediante inyecciones sistémicas de **azida sódica** suprime el efecto activador que las inyecciones intra-VTA de etanol ejercen sobre el SMCL (Marti-Prats y col., 2013).

Si la reducción del metabolismo del etanol, y por tanto de la formación del ACD, conduce a una disminución de los efectos del etanol sobre algunos comportamientos, la situación contraria, es decir, la promoción del mismo debería conducir a su aumento. Algunos estudios demuestran que el **incremento de la actividad** de la **CATALASA** incrementa los efectos estimulantes motores del etanol. Así, la administración aguda de **acetato de plomo** o la administración crónica de **cianamida**, actuaciones ambas que producen un aumento en la actividad catalítica de la catalasa, se traducen en una potenciación de los efectos estimulantes motores del etanol, tras la

administración i.p. en ratones Swiss (Correa y col., 1999; Correa y col., 2004; Correa y col., 2005; Sanchis-Segura y col., 1999). Existen otras sustancias, como el **ácido 3-nitropropiónico**, que incrementan la actividad de la catalasa, y que conducen también a un aumento de los efectos psicoestimulantes del etanol en ratones (Manrique y col., 2006). Otra metodología empleada para promocionar la actividad de la catalasa, ha sido el incremento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante hiperoxia normobárica. Esta aproximación también se ha traducido en un aumento de la respuesta motora al etanol tras la administración del mismo en ratones (Pastor y col., 2002). Por último, recientemente, nuestro grupo también ha demostrado que el bloqueo del metabolismo cerebral del ACD por parte de la ALDH, mediante el empleo de cianamida, incrementa los efectos estimulantes motores del etanol inyectado localmente en VTA (Marti-Prats y col., 2013).

Además de afectar la actividad motora de los animales de experimentación, el etanol es capaz de inducir otras respuestas conductuales tras su administración (reflejo postural, ansiedad, etc), para las cuales se ha sugerido también una clara implicación del ACD empleando las mismas estrategias antes mostradas. Como en el caso de la actividad motora, los estudios que analizaron la implicación del ACD en estas respuestas se basaron en la manipulación fundamentalmente de la actividad de la catalasa, con la posible excepción del análisis del consumo voluntario de etanol, en relación al cual, se han desarrollado estudios relevantes que han manipulado tanto la ALDH como la ADH. Los resultados obtenidos en estos ensayos aunque muestran mayoritariamente la implicación del ACD en las diferentes repuestas conductuales del etanol ensayadas, no siempre han sido coincidentes (ver revisión de Correa y col 2012).

Por último cabe mencionar, diversos **estudios electrofisiológicos y neuroquímicos** que, mediante la modulación de las enzimas implicadas en el metabolismo del etanol, han evidenciado también la importancia del ACD en la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA por parte del

## *Antecedentes*

etanol. Estos estudios, han utilizado inhibidores de la enzima ADH o inhibidores de la catalasa para demostrar las consecuencias que la reducción de la producción del ACD tiene en la activación que el etanol genera en el SMCL. En concreto, Foddai y col. demostraron que tanto la administración intravenosa de ACD como la de etanol eran capaces de provocar una activación dosis-dependiente de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Foddai y col., 2004). Pero, la administración de un antagonista de la ADH (**4-metilpirazol**) fue capaz de impedir la activación producida por el etanol aunque, no tuvo ningún efecto sobre la generada por el ACD. La inhibición de la catalasa fue también capaz de suprimir la activación de las neuronas del SMCL producida por el etanol (Melis y col., 2007).

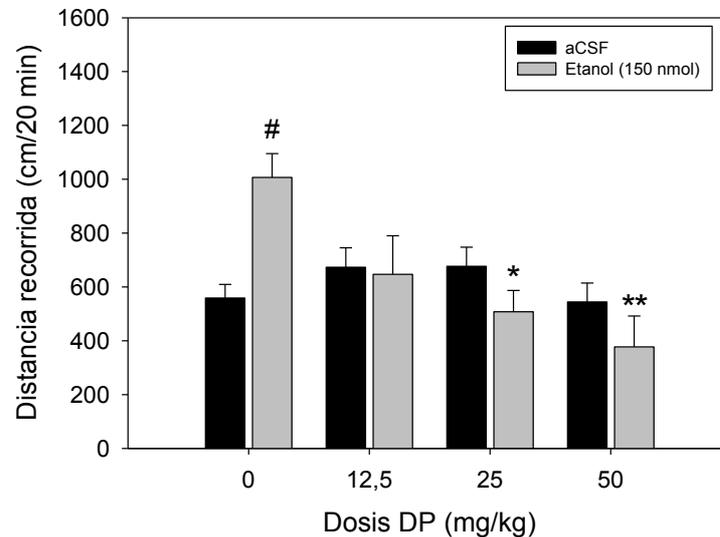
### **2.8.4 Secuestro o inactivación química del ACD y modulación de los efectos del etanol sobre el SMCL.**

La estrategia alternativa para demostrar la implicación del ACD en el desarrollo de los efectos psicoactivos del etanol, consiste en el empleo de los llamados **agentes secuestrantes del ACD**. Con el manejo de estas sustancias se pretende “inactivar”, desde el punto de vista farmacológico, el ACD que haya podido generarse tras el metabolismo del etanol. Se han usado, para tal fin, dos aminoácidos azufrados: la D-penicilamina (DP) y la L-cisteína. Estos compuestos interactúan con el ACD para formar aductos estables e inactivos (Kera y col., 1985; Nagasawa y col., 1980), que han podido detectarse, para el caso de la DP, en plasma, hígado y cerebro de rata tras la administración de etanol (Serrano y col., 2007).

En relación a los estudios conductuales que utilizan la **DP**, cabe destacar que este agente secuestrante se ha mostrado capaz de reducir las distintas respuestas conductuales provocadas por el etanol. Así pues, Font y col. (Font y col., 2005) demostraron que el pretratamiento intraperitoneal (i.p.) con DP es capaz de reducir de modo dosis-dependiente la estimulación motora generada por la administración de etanol en ratones, sin afectar a la

estimulación generada por la cocaína o la cafeína, mostrando claramente la especificidad de acción de este aminoácido. Estos mismos autores mostraron posteriormente que el pretratamiento i.p. con DP también atenúa los efectos ansiolíticos (Correa y col., 2008) y el desarrollo del condicionamiento de preferencia de lugar generado por la administración i.p. de etanol en ratones (Font y col., 2006a). Del mismo modo, previene el desarrollo del condicionamiento de preferencia de lugar en ratas generado por la administración intragástrica de etanol (Peana y col., 2008).

Nuestro grupo también ha demostrado en experimentos paralelos a los realizados en esta Tesis Doctoral que la DP es capaz de bloquear, de un modo dosis-dependiente, las respuestas activadoras inducidas por el etanol cuando éste es directamente administrado en el VTA-p (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Efecto de la administración intraperitoneal de diferentes dosis de DP, 30 minutos antes de la administración intra-VTA de aCSF (barras negras) o 150 nmol de etanol (barras grises), en la actividad locomotora de la rata. Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e. Los *asteriscos* indican la existencia de diferencias significativas respecto al grupo que recibió 0 mg/kg de DP + etanol (test de Dunnet: \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ ). La *almohadilla* indica la existencia de diferencias significativas respecto al grupo que recibió aCSF ( $\# < 0.05$ ). No se observaron diferencias entre los grupos que recibieron inyecciones de aCSF intra-VTA.

## *Antecedentes*

También se ha analizado el efecto de la DP en del consumo voluntario de etanol en ratas Long Evans cuando se administra a nivel local en el cerebro (intracerebroventricularmente) (Font y col., 2006b). Los resultados mostraron que este agente secuestrante es capaz de producir una disminución de la ingesta de etanol.

El otro secuestrante empleado en este tipo de estudios, la **L-cisteína**, también es capaz de prevenir algunas de las respuestas conductuales desencadenadas por el alcohol. Por ejemplo, Peana y col. mostraron que este aminoácido es capaz de prevenir de forma dosis dependiente el desarrollo del condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) observado tras la administración intragástrica de etanol sin modificar el CPP inducido por morfina, confirmando la especificidad de este aminoácido (Peana y col., 2009). Sin embargo, el pretratamiento i.p. con L-cisteína parece ejercer un efecto no preventivo en lo relativo a las respuestas motoras, ya que este compuesto es capaz de incrementar el efecto estimulante motor inducido por la administración i.p. en ratones (Escarabajal y col., 2001). Una posible explicación a estos hallazgos contradictorios podría encontrarse en la diferente estabilidad de los aductos generados, ya que de ello depende el éxito de la estrategia de secuestro del ACD (Nagasawa y col., 1984). De hecho, los autores propusieron que el aducto formado entre el ACD y la L-cisteína, sería inestable, de modo que podría liberar de modo prolongado y diferido en el tiempo el ACD inicialmente secuestrado, pudiendo así mantener los niveles de ACD en el cerebro elevados durante más tiempo, es decir, el aducto podría actuar como una fuente inesperada y no deseada de ACD libre (Nagasawa y col., 1984).

Además, también se ha demostrado que la L-cisteína, administrada i.p. es capaz de reducir la autoadministración de etanol y el comportamiento de reinicio a la ingesta de etanol en ratas (Peana y col., 2010).

Por último, en estudios neuroquímicos y electrofisiológicos también se ha mostrado que la inactivación química del ACD por la DP y la L-cisteína es

capaz de suprimir la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens *shell* inducida tanto por el etanol como por el ACD, así como la excitación de las neuronas DA del VTA producida por el etanol (Enrico y col., 2009; Sirca y col., 2011).

En resumen, **los resultados de estos estudios constituyen claramente la base científica que soportaría el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica: el uso de los agentes secuestrantes en la prevención de las recaídas en el alcoholismo.** De hecho, existe un consenso entre los investigadores anteriormente citados de que esta estrategia terapéutica, potencialmente útil, merece más atención e investigación. En esta Memoria, como más adelante se detalla, nos hemos ocupado de este aspecto, poco investigado hasta el momento.

#### **2.8.5 Implicación del sistema opioide endógeno en los efectos estimulantes motores del etanol.**

Como ya mencionamos con anterioridad, el sistema opioide endógeno ha sido íntimamente relacionado con los efectos estimulantes motores generados por la administración sistémica de etanol. Numerosos estudios han demostrado que la administración sistémica de antagonistas no selectivos de los receptores opioides, como la NTX, es capaz de bloquear la activación motora inducida por la administración intraperitoneal de etanol en diversas estirpes de ratón (Camarini y col., 2000; Kiianmaa y col., 1983; Pastor y col., 2005; Pastor y col., 2006; Sanchis-Segura y col., 2005). Pastor y col. (Pastor y col., 2005; Pastor y col., 2006) desarrollaron un conjunto de experiencias que intentaban clarificar cuál era la participación de cada uno de los distintos subtipos de receptor opioide en los efectos del etanol. Los autores mostraron que el antagonista de **los receptores opioides del subtipo  $\delta$** , naltrindole, no era capaz de alterar el incremento en la locomoción inducida por la administración sistémica de etanol en ratones, mientras que el bloqueo selectivo del **receptor opioide  $\mu$**  sí lo fue, aunque el

## *Antecedentes*

perfil del bloqueo dependió del subtipo de receptor  $\mu$  considerado ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\mu_3$ ). Es interesante también señalar que los ratones deficientes en el receptor opioide de tipo  $\mu$  poseen una respuesta motora reducida, en relación a la evocada en ratones normales por el etanol administrado periféricamente (Hall y col., 2001). Estos hallazgos parecen apuntar a los receptores opioides de tipo  $\mu$  como un eslabón necesario en el desarrollo de las respuestas motoras al etanol. Pero, **¿cuál es el mecanismo a través del cual estos receptores participan en los efectos del etanol?**

Inicialmente, se postuló que el efecto atenuante de algunos antagonistas sobre la estimulación asociada al etanol podría deberse a un hipotético efecto de estos agentes sobre el metabolismo del etanol (Badawy y col., 1981). Sin embargo, varios estudios posteriores mostraron que los niveles de etanol, tanto cerebral como plasmático, no se veían alterados tras la administración de NTX, lo que aparentemente descartaba un cambio en la eficacia de las rutas biotransformadoras del etanol (Kiiianmaa y col., 1983; Pastor y col., 2006).

La posibilidad alternativa para explicar cómo los antagonistas opioides prevenían la aparición de los efectos del etanol era asumir que el etanol ejerciera sus efectos sobre el SMCL modulando la actividad de estos receptores. Efectivamente, Xiao y col. han mostrado, mediante estudios electrofisiológicos, que el etanol inhibe a través de un mecanismo mediado por los **MORs** la actividad de las neuronas GABAérgicas locales (Xiao y col., 2007), las cuales inhiben tónicamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Johnson y col., 1992). El resultado final es una excitación de dichas neuronas dopaminérgicas por parte del etanol como consecuencia de su “desinhibición”. Obviamente, a la luz de las investigaciones antes revisadas sobre el papel del ACD en los efectos del etanol, esta perspectiva abría un interrogante adicional: **¿participa también el ACD en la modulación de la actividad de los MORs en el SMCL?**

Nuestro grupo demostró que el bloqueo de los MORs impide que, tanto el etanol como el ACD, evoquen sus respuestas activadoras tras su administración localizada en VTA-p (Sanchez-Catalan y col., 2009). Así, el bloqueo no selectivo y localizado de los receptores opioides en VTA con NTX, fue capaz de suprimir la activación locomotora generada por la administración tanto de etanol como de ACD, indicando que estos receptores son un mediador necesario de los efectos de estos compuestos en la rata. Del mismo modo, nuestro grupo demostró que el bloqueo localizado y selectivo de los MORs, mediante el uso de  $\beta$ -FNA, suprimía los efectos estimulantes locomotores de estos compuestos, señalando así de un modo más concreto a este subtipo de receptores opioides como los mediadores necesarios de los efectos activadores tanto del etanol como del ACD.

#### **2.8.6 El “secuestro” del ACD por aminoácidos azufrados: una estrategia de tratamiento complementaria.**

Si el ACD, actuando a través de los MORs, es necesario para la activación del SMCL, el bloqueo de su formación (empleando inhibidores metabólicos adecuados) o su inactivación química (empleando agentes secuestrantes) podrían convertirse en estrategias terapéuticas antirecaída eficaces, similares en términos generales a las vacunas, al evitar el efecto “priming” en eventuales episodios de nuevo contacto con la droga.

Es importante remarcar que el uso de inhibidores de la producción de ACD (como los inhibidores de la catalasa, ampliamente estudiados por el grupo del Dr. Carlos Aragón de la Universitat Jaume I) como una nueva forma de intervención terapéutica, parece no ser viable debido a los más que previsibles efectos secundarios de estos compuestos, que desaconsejarían su uso a largo plazo en clínica. En opinión de algunos autores, y según los datos disponibles actualmente (Font y col., 2005; Peana y col., 2009), la alternativa más posibilista, como nueva forma de intervención terapéutica, sería la que haría uso de los agentes secuestrantes del ACD, en especial de

## *Antecedentes*

los aminoácidos sulfurados DP y L-Cisteína. El ACD es una molécula altamente reactiva que puede ser secuestrada rápidamente debido a que tanto la DP como la L-Cisteína contienen un grupo tiol capaz de unirse covalentemente al ACD, formando productos de condensación (tiazolidinas) estables y farmacológicamente inactivos (Nagasawa y col., 1980; Salaspuro y col., 2006), que han podido detectarse como anteriormente se comentó, para el caso de la D-penicilamina, en plasma, hígado y cerebro de la rata tras la administración de etanol (Serrano y col., 2007).

Los grupos liderados por el Dr. Marco Diana en Italia, y el nuestro en España, hemos defendido la inactivación química del ACD con agentes secuestrantes como una vía alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento de la recaída en el alcoholismo. Nuestros compañeros italianos, utilizando un modelo preclínico de reanudación y la rata como animal de experimentación, han encontrado que la L-cisteína reduce tanto la autoadministración oral de etanol (adquisición y mantenimiento) como la reanudación que se observa tras la fase de extinción (Peana y col., 2010). Además este aminoácido también fue capaz de reducir la adquisición, mantenimiento y el efecto de la privación en la autoadministración oral de ACD (Peana y col., 2012).

Nuestro grupo, a través de los trabajos que, en parte constituyen la presente Tesis Doctoral, viene defendiendo el empleo de la DP para el mismo fin. En este sentido cabe destacar que la DP es un fármaco ya comercializado para otros fines (para el tratamiento de la artritis reumatoide), no presenta efectos indeseables destacables y es bien tolerada incluso cuando se administra de forma crónica. Dado que, a día de hoy, no existen trabajos experimentales que analicen la potencialidad de este aminoácido en la prevención de las recaídas en modelos preclínicos de alcoholismo, hemos decidido en esta Tesis abordar dicho estudio.

## **3 OBJETIVOS**



En general, la Memoria que se presenta, plantea y analiza la eficacia preclínica de una nueva estrategia terapéutica para la prevención de las recaídas en el consumo de alcohol basada en el uso único de agentes secuestrantes del ACD, en concreto de la DP, o bien su combinación con otras terapias existentes. Una vez demostrada su eficacia a nivel preclínico, este trabajo trata de dictar las bases farmacocinéticas necesarias para el desarrollo de nuevos sistemas farmacéuticos que permitan su adecuada administración en la prevención de las recaídas.

Para ello, se han abordado los siguientes OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Analizar la eficacia de la DP tras su administración por vía sistémica (vía subcutánea) en la prevención de la recaída en el consumo de etanol en ratas expuestas a un modelo de alcoholización a largo plazo. La efectividad de esta intervención se evaluará a través de la medida del fenómeno ADE.
2. Evaluar la selectividad y especificidad de acción de la DP en el secuestro del ACD para la prevención de la recaída: análisis de otras posibles acciones.
3. Explorar la participación de la región posterior del área tegmental ventral (VTA-p) en la acción farmacológica de la DP para la prevención de la recaída.
4. Correlacionar las concentraciones plasmáticas y en tejido cerebral de DP con su nivel de eficacia antirecaída y obtención de datos farmacocinéticos básicos de la DP.
5. Evaluar la efectividad antirecaída de una terapia combinada basada en la administración de un agente secuestrante del ACD (DP) y un antagonista de los receptores opioides (NTX) en el modelo preclínico validado anteriormente.



## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**



#### 4.1 Compuestos ensayados y soluciones de trabajo.

El compuesto objeto de estudio en esta memoria es la **D-Penicilamina (DP)**. Su denominación química es ácido D-2-amino-3-mercapto-3-metilbutanoico (riqueza 98-101%). Esta molécula cuenta con un peso molecular de 149,21 g/mol y ha sido suministrada por Sigma Chemical Co<sup>®</sup>, St Louis, MO, USA. Su estructura química se muestra en la siguiente figura:

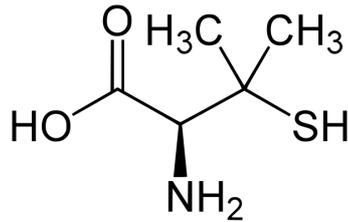
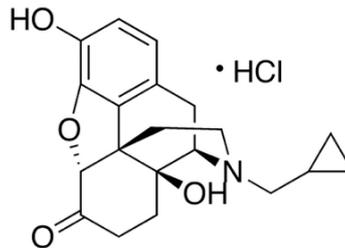


Figura 4.1. Estructura química de la D-Penicilamina

Para su **administración sistémica**, ésta se ha disuelto en agua estéril a la concentración de **25 ó 100 mg/ml** en el momento de su administración. Para su **administración local en el cerebro**, la DP se ha disuelto en agua estéril a la concentración de **1.5 mg/ml**.

## Materiales y Métodos

El **clorhidrato de naltrexona (NTX)** ( $C_{20}H_{23}NO_4 + HCl$ ), antagonista de amplio espectro de los receptores opioides, ha sido suministrado por Tocris (Bristol, UK). Su estructura química se muestra en la Figura 4.2. La NTX se disolvió en agua estéril a la concentración de **5 mg/ml** en el momento de su administración.



**Figura 4.2.** Estructura química del clorhidrato de naltrexona

Todas las **soluciones de etanol** empleadas (**5, 10 y 20% (v/v)**) se prepararon a partir de etanol absoluto, sin indicador, suministrado por Scharlau<sup>®</sup> (Madrid), mediante dilución con agua desionizada.

#### **4.2 Animal de experimentación.**

El animal de experimentación empleado para la realización de este trabajo ha sido la rata macho Wistar ( $275 \pm 10$  gramos), que contaba con aproximadamente 8 semanas de vida en el momento de su inclusión en el estudio.

Todos los animales se han criado en el Servicio de Experimentación Animal de la Universitat de València, situado en la Facultad de Farmacia, y se han mantenido con una dieta sólida estándar [“Global Diet 2014”; suministrada por Harlan Laboratories Inc; Madison (USA)] en perfectas condiciones higiénicas y climáticas:

- Temperatura:  $23 \pm 1$  °C
- Humedad: 60%
- Ciclos de luz y oscuridad 12-12 horas (conexión de 8:00 a 20:00 h)

Los animales se estabularon en jaulas individuales de polipropileno (425 x 266 x 185 mm) con acceso libre a comida y agua.

Todos los procedimientos de trabajo han sido revisados y aprobados por el Comité Ético de la Universitat de València y se han realizado cumpliendo con todas las normas vigentes sobre experimentación animal (Directiva 86/609/CEE, transpuesta en España a través del RD 1201/2005 y RD 53/2013).

### **4.3 Protocolo de alcoholización a largo plazo con fases repetidas de abstinencia.**

Para poder reproducir el fenómeno de recaída en el consumo de etanol, se ha utilizado el protocolo experimental empleado por el grupo de R. Spanagel (Spanagel y col., 1999) realizando las modificaciones oportunas para adaptarlo a nuestras condiciones experimentales. Por ello, en las fases iniciales de este trabajo se ha tratado de caracterizar este protocolo empleando los animales de nuestra colonia. Los datos obtenidos se muestran y discuten en capítulos siguientes. Brevemente, se trata de un **protocolo de larga duración** en el que se incluyen una serie de **fases de abstinencia** que se distribuyen aleatoriamente a lo largo de todo el periodo experimental y que permiten reproducir de una manera robusta las **recaídas** producidas por la reexposición al etanol a través de la medición del conocido como **fenómeno ADE**, el cual se manifiesta después de cada periodo de abstinencia.

**Nota:** A partir de este momento, y con objeto de facilitar la redacción de esta memoria, la expresión *modelo ADE* se empleará para hacer referencia al *protocolo de alcoholización a largo plazo con fases de abstinencia repetidas*. Mientras que la expresión *fenómeno ADE* o simplemente *ADE* se utiliza para hacer referencia al incremento temporal en el consumo de alcohol tras un periodo de abstinencia.

En la Tabla 4.1 se resume la nomenclatura y la duración de las diversas *fases de ingesta* y *de abstinencia* (expresadas en semanas) empleadas en el presente trabajo.

FASE	DURACIÓN (semanas)	SEMANAS TOTALES
HABITUACIÓN	2	2
INGESTA I	8	10
ABSTINENCIA I	2	12
INGESTA II	6	18
ABSTINENCIA II	3	21
INGESTA III	5	26
ABSTINENCIA III	2.5	28.5
INGESTA IV	6	34.5
ABSTINENCIA IV	2.5	37
INGESTA V	5	42
ABSTINENCIA V	2	44

**Tabla 4.1.** Esquema temporal del modelo de alcoholización empleado.

Como se aprecia, el protocolo comienza con una fase de habituación al aislamiento en la jaula individual. Trascurrido este período inicial, se da paso a la fase de alcoholización propiamente dicha en la que se alternan fases de exposición al alcohol (*“fase de ingesta”*) con fases de privación forzada (*“fase de abstinencia”*). Durante la *fase de ingesta*, los **animales tienen acceso libre a cuatro botellas** de líquido: una botella con **agua** y 3 botellas que contienen **etanol al 5, 10 y 20% (v/v)**, respectivamente. Estas concentraciones de etanol son equiparables a las existentes en las bebidas alcohólicas más habituales (cerveza, vino y bebidas espirituosas). Durante las *fases de abstinencia* se retiran las tres botellas con etanol,

## *Materiales y Métodos*

permaneciendo únicamente la de agua. Independientemente de la fase experimental, **los animales siempre tienen acceso *ad libitum* a la dieta sólida.**

La duración de las diferentes **fases de ingesta y abstinencia** es **premeditadamente irregular** con el objetivo de prevenir mecanismos conductuales de adaptación (Vengeliene y col., 2007).

Paralelamente y durante las 44 semanas que dura el estudio, siempre se mantiene un grupo de ratas con acceso *ad libitum* al agua de bebida y dieta sólida. Este grupo sirve para conocer la evolución natural en términos de peso corporal, de animales congéneres expuestos a una dieta normal, es decir en ausencia de consumo de alcohol y estabulados aisladamente como ocurre con los sujetos experimentales.

La ingesta de las diferentes disoluciones etanólicas, así como de agua, se cuantifica a lo largo de todo el procedimiento experimental. Las lecturas se realizan cada dos días, **cuantificándose los volúmenes consumidos, mediante pesada de las diferentes botellas.** Durante la fase de ingesta todas las soluciones se renuevan semanalmente, momento que se aprovecha para pesar a los animales. Además, siempre se ha tenido la precaución de cambiar regularmente y de forma aleatoria la posición de las 4 botellas con el fin de evitar preferencias de lugar.

La determinación del consumo de alcohol por parte de cada animal ha permitido la **caracterización de este protocolo**, así como la demostración de su **validez para reproducir el fenómeno de la recaída.** Para llevar a cabo esta caracterización, se ha seleccionado una **muestra aleatoria de 25 animales** y se ha procedido a su análisis. Los registros obtenidos han demostrado que bajo el paradigma empleado (autoadministración con 4 botellas), los animales de nuestra colonia beben alcohol de modo regular y de manera voluntaria. Además, **tras cada periodo de abstinencia forzada** al que son expuestos, **manifiestan un incremento significativo y temporal**

**del consumo de etanol (ADE) propio de un fenómeno de recaída en el consumo.**

*Determinación de niveles plasmáticos de etanol en animales.*

Como una caracterización adicional del protocolo empleado, también se ha cuantificado la **concentración plasmática de etanol** en los animales expuestos a este protocolo. Es un hecho conocido que el ritmo circadiano del roedor es completamente diferente al del ser humano. En concreto, el periodo de mayor actividad en la rata tiene lugar durante la fase oscura (de 20.00 a 8.00 h en nuestro animalario). Por esta razón, las determinaciones se han realizado a los siguientes tiempos:

- 15:00 ( A mitad, aproximadamente, del ciclo de luz)
- 22:00 ( A las dos horas del comienzo del ciclo de oscuridad)
- 08:00 ( Al final del periodo de oscuridad)

Se seleccionaron **18 animales** de la colonia que estaban expuestos al procedimiento de alcoholización voluntario a largo plazo. Las muestras de sangre se tomaron durante la fase de Ingesta IV, a los anteriores tiempos.

**Para cada tiempo experimental prefijado se seleccionaron 6 de los 18 animales elegidos para el estudio.** A cada uno de ellos se le extrajo una pequeña muestra de sangre (0.25 ml) mediante punción en la vena safena lateral de su extremidad trasera. Para la cuantificación de las concentraciones de etanol en plasma se ha utilizado un kit comercial de la casa comercial Roche® (Cat.No. 10176290035), empleado habitualmente en nuestro laboratorio y validado por nuestro grupo investigador en anteriores trabajos (Hipolito y col., 2009).

## *Materiales y Métodos*

*Realización de los ensayos farmacológicos. Criterios de inclusión de los sujetos animales.*

Los estudios farmacológicos conducentes a evaluar la eficacia antirecaída de los tratamientos ensayados en esta memoria (Experimentos 1, 3 y 5) siempre han comenzado **48 horas antes de la finalización del periodo de abstinencia V**. A la finalización del mismo, fueron reintroducidas las disoluciones de alcohol y cuantificada la ingesta diaria de las diferentes soluciones de bebida con el fin de evaluar la magnitud del fenómeno ADE bajo la influencia de los distintos tratamientos farmacológicos ensayados. Sólo se han incluido en el estudio farmacológico a aquellos animales que **cumplieron con los dos requisitos** siguientes:

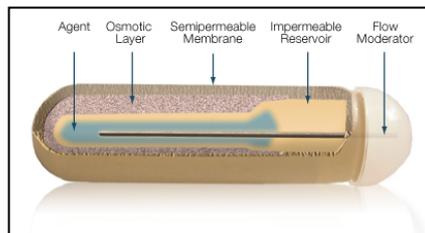
1. Haber observado un incremento en el consumo de alcohol tras la fase de abstinencia (ADE), considerándose el *fenómeno ADE* “suficiente”, cuando el incremento en el **consumo de etanol** en los días post-abstinencia ha **superado al menos el 150% de su consumo basal** (pre-abstinencia).
2. Haber manifestado el *fenómeno ADE* en, al menos, **3 de las 4 ocasiones** en las que han sido sometidos a un proceso de abstinencia y posterior reintroducción del alcohol.

#### 4.4 Procedimientos de trabajo y métodos quirúrgicos:

##### 4.4.1 Mini-bomba osmótica Alzet®: preparación y llenado.

La administración de un agente farmacológico mediante una **bomba osmótica Alzet®** permite su administración de forma continuada según una cinética de incorporación de orden 0, lo cual permite asegurar niveles constantes o estacionarios del fármaco durante periodos más o menos largos de tiempo.

Con esta mini-bomba osmótica, se consigue una liberación controlada del fármaco sin necesidad de realizar conexiones externas ni manipular al animal por parte del investigador.



**Figura 4.3.** Esquema de una bomba osmótica Alzet®

Como se puede observar en la Figura 4.3, la **bomba Alzet®** está compuesta principalmente por: 1) una membrana externa semipermeable, 2) un depósito con un alto contenido en sales, el cual le confiere una elevada osmolaridad, 3) un reservorio interno impermeable donde se introduce la solución que queremos infundir y 4) un modulador de flujo compuesto por un tubo de acero que va desde el reservorio hasta el exterior de la bomba y que cumple dos funciones: liberar el contenido de la bomba a la velocidad adecuada y proporcionar un medio para la posible fijación de un catéter. De esta forma, la **fuerza impulsora se genera por la diferencia de presiones** existente entre el depósito salino de la bomba y el medio extracelular donde se implante. La elevada osmolaridad del interior de la bomba hace que el

## Materiales y Métodos

agua extracelular del tejido penetre a través de la membrana semipermeable, comprima la membrana interna impermeable y desplace la solución de su interior a través del modulador de flujo hasta el exterior.

Existen diferentes **modelos comercializados** en virtud de su **volumen de carga** y su **velocidad de liberación**. En los experimentos que se presentan en esta memoria se han empleado los **modelos 2ML1** y **2001**, cuyas características se resumen en la Tabla 4.2.

	Modelo 2ML1	Modelo 2001
Volumen del reservorio	2 ml	200 $\mu$ l
Flujo de liberación	10 $\mu$ l/h ( $\pm$ 1.5 $\mu$ l/h)	1 $\mu$ l/h ( $\pm$ 0.07 $\mu$ l/h)
Vida útil	7 días	7 días
Empleado en el experimento nº	1, 2, 4 y 5	3

**Tabla 4.2.** Modelos y características de las bombas Alzet<sup>®</sup> empleadas en esta memoria.

La **bomba 2ML1** se ha empleado para la administración subcutánea de DP en los **experimentos 1, 2, 4 y 5**. En estos experimentos, la concentración de las soluciones de DP empleadas ha sido 25 ó 100 mg/ml, por tanto, las velocidades de infusión ensayadas fueron de 250 ó 1000  $\mu$ g/h respectivamente. Por otro lado, la **bomba 2001** se ha empleado exclusivamente para la administración a velocidad constante de una solución de 1.5 mg/ml en el VTA-p de las ratas (**Experimento 3**), por lo que la velocidad de infusión fue de 1.5  $\mu$ g/h.

El llenado de la bomba osmótica con la solución medicamentosa que se desea administrar siempre se realizó en una cámara de flujo laminar minutos antes de su implantación. Este proceso siempre fue realizado siguiendo las recomendaciones dictadas por el fabricante:

- Todas las soluciones se sometieron a un proceso de filtración esterilizante (Millex® 0.22µm) previo.
- Mediante pesada, se confirmó que el llenado del reservorio de cada bomba fue total.

#### **4.4.2 Implantación quirúrgica de la bomba osmótica.**

Para la implantación quirúrgica de la bomba, los animales se han anestesiado con isoflurano (1.5 MAC) por vía inhalatoria siguiendo las indicaciones que se describen en la tabla 4.3.

	<b>Inducción</b>	<b>Mantenimiento</b>
<b>Isoflurano</b>	3-4%	1.5-3%
<b>Flujo de oxígeno</b>	1-3 L/min	< 1.5 L/min

**Tabla 4.3.** Protocolo de anestesia con isoflurano por vía inhalatoria. El Flujo de oxígeno variará en función del tamaño de la cámara.

## *Materiales y Métodos*

Una vez anestesiado el animal, se rasura la zona de implantación (zona dorso-lateral) y se le inmoviliza sobre un tablero quirúrgico. Seguidamente, se desinfecta la zona con povidona yodada al 10% y se practica una incisión de aproximadamente unos 2 centímetros con un bisturí. A continuación, con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras de punta roma, se separa la piel del músculo creándose así el espacio suficiente para alojar la bomba osmótica en el territorio subcutáneo. Posteriormente, se introduce la bomba con la precaución de que el “modulador de flujo” siempre quede alojado en el extremo opuesto al de la incisión realizada (ver Figura 4.4). Finalmente, la herida practicada se desinfecta con povidona yodada al 10% y se sutura con grapas estériles.

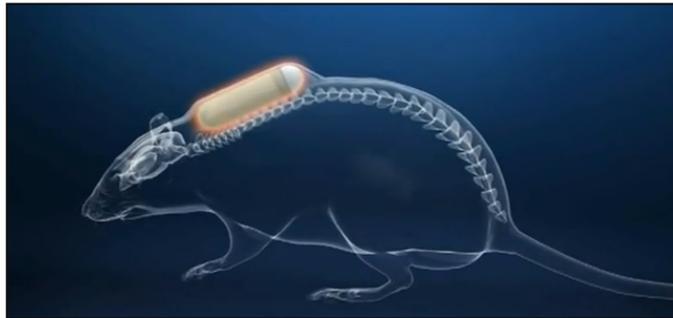


**Figura 4.4.** Detalle de la introducción de la bomba osmótica en el territorio subcutáneo a través de la incisión practicada.

## *Materiales y Métodos*

Hasta la completa recuperación del animal de la anestesia, éste se mantiene sobre una manta calefactora. Por último, se le devuelve a su caja de estabulación habitual.

El tiempo requerido para completar la implantación de la bomba siempre ha sido inferior a 15-20 minutos. Este procedimiento se ha empleado en los experimentos 1, 2, 4 y 5 de la presente memoria.



**Figura 4.5.** Localización de la bomba en el dorso de un animal recuperado

#### **4.4.3 Implantación estereotáxica de la cánula de administración en VTA-p.**

A todos los animales empleados en el Experimento 3 se les ha implantado mediante **cirugía estereotáxica**, una **cánula de 22G** (Plastics One, 3220P/Spc) en cada hemisferio cerebral conectada, cada una de ellas, a una mini bomba osmótica (**modelo Alzet® 2001**) que contenían **DP** (1.5 mg/ml/bomba) o **vehículo** según el grupo experimental considerado. Es decir, en cada animal se han implantado 2 bombas osmóticas en el territorio subcutáneo (una en cada lomo), y 2 cánulas (una en cada hemisferio cerebral). En la Figura 4.6 se puede observar el detalle de la cánula metálica empleada, la cual forma un ángulo de 90°. En la Figura 4.7 se muestra un esquema del conjunto de la cánula conectada a la bomba osmótica a través de un tubo de polietileno.



**Figura 4.6.** Detalle de la cánula Plastics One, modelo 3220P/Spc empleada para la infusión del fármaco en el VTA-p de la rata.



**Figura 4.7.** Esquema de la bomba Alzet® conectada a la cánula de Plastics One (modelo 3220P/Spc) mediante un tubo de polietileno (PE 10).

El procedimiento para la implantación quirúrgica de todo éste conjunto se resume a continuación: en primer lugar se procede al llenado de la bomba con las soluciones a ensayar en una cámara de flujo laminar (ver indicaciones descritas en el epígrafe 4.4.1). Seguidamente, se anestesia al animal con isoflurano (1.5 MAC) por vía inhalatoria según el protocolo descrito en la Tabla 4.3 y se le coloca en un equipo estereotáxico (Stoelting®). Tras ello, se practica una incisión longitudinal (1-2 cm) en la piel de la parte superior de la cabeza y se aplica un gel de lidocaína al 10% en los bordes de la incisión practicada. A partir de este momento, queda a la vista el cráneo del animal, permitiendo la visualización de los puntos bregma y lambda que sirven de referencia para la implantación de las cánulas en el **VTA-p**. A continuación, se practican 4 orificios en el cráneo, dos para los tornillos de anclaje y otros dos para introducir las cánulas metálicas.

## *Materiales y Métodos*

Las coordenadas con respecto al punto bregma, se seleccionaron a partir del Atlas de Paxinos y Watson (Paxinos G y col, 2007). Las coordenadas empleadas fueron las siguientes:

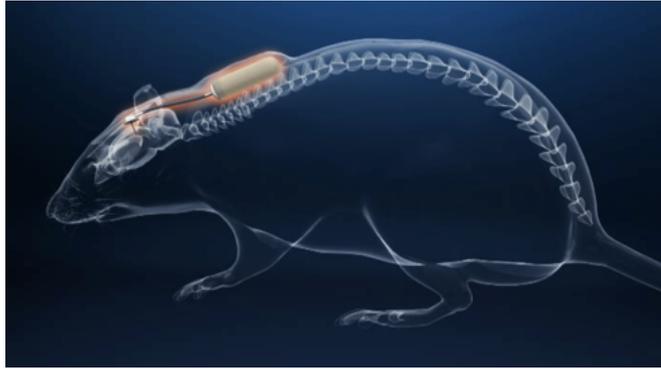
### Experimento 3A: Implantación en VTA-p

- A/P: -5.9 mm
- L:  $\pm 1.9$  mm
- D/V: **-8.3 mm**. La cánula fue introducida con un ángulo de  $\pm 10^\circ$  respecto a la vertical

### Experimento 3B: Implantación próxima al VTA-p, pero deliberadamente dorsales al mismo

- A/P: -5.9 mm
- L:  $\pm 1.9$  mm
- D/V: **-6.3 mm**. La cánula fue introducida con un ángulo de  $\pm 10^\circ$  respecto a la vertical

Cada cánula se fija con cemento dental *Rapid Repair* (Dentsplay®) a uno de los tornillos de anclaje. Una vez ha polimerizado el cemento dental, se implanta cada bomba (que ha sido previamente llenada y conectada a la cánula) en el dorso del animal como se señaló anteriormente. Este procedimiento se repite para el otro hemisferio cerebral y en la zona dorsal contraria del animal. Finalmente, se procede a desinfectar la herida con povidona yodada al 10% y se sutura con hilo de seda o grapas quirúrgicas. En la Figura 4.8 se puede visualizar un esquema donde se aprecia la ubicación de la bomba en la zona dorsal y de la cánula en el cerebro de la rata.



**Figura 4.8.** Esquema detallado de implantación cerebral de la bomba osmótica.

Hasta la completa recuperación del animal de la anestesia, éste se coloca sobre una manta calefactora. Finalmente, se le devuelve a su caja de estabulación habitual. El tiempo requerido para completar esta implantación bilateral es de alrededor de 50-60 minutos por animal.

#### **4.4.4 Implantación de cánula en la vena yugular y toma de muestras.**

La técnica de canulación permanente de la vena yugular de la rata ha sido empleada y descrita con cierto detalle por nuestro grupo de investigación en anteriores trabajos (Torres-Molina y col., 1996).

Brevemente, el proceso de canulación comienza con la anestesia del animal con una solución que contiene una mezcla de ketamina/xilacina (95 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina), administrada mediante inyección intraperitoneal.

Una vez anestesiado el animal, se coloca en el tablero de operaciones en posición de decúbito supino y se le fijan las extremidades, con cinta adhesiva, al tablero.

Posteriormente se localiza la zona media clavicular y con la ayuda de unas pinzas de diente de ratón y unas tijeras de punta roma se practica la incisión, de forma longitudinal, de la piel del animal. A continuación, se separan las capas superiores de tejido subcutáneo con la ayuda de unas tijeras de punta fina y unas pinzas de diente de ratón de menor tamaño a las anteriormente utilizadas, hasta dejar al descubierto aproximadamente 1 cm de la vena (ver Figura 4.9; panel 1).

Al extremo largo de la cánula de implantación previamente fabricada se conecta una jeringuilla que contiene suero fisiológico heparinizado (20.000 UI/L) y atemperado a 37 °C. Se comprueba que la cánula funciona correctamente y se deja llena de suero. Al extremo corto se le conecta la aguja de implantación (Figura 4.9; panel 2).

Posteriormente, se introduce cuidadosamente la punta de la aguja de implantación en la parte alta de la vena, avanzando aproximadamente 5 mm por el interior de la misma, en dirección hacia el corazón, hasta que se saca de nuevo al exterior. Lentamente, se tira de la aguja al tiempo que se gira sobre su eje hasta que el extremo de la cánula queda fuera de la vena

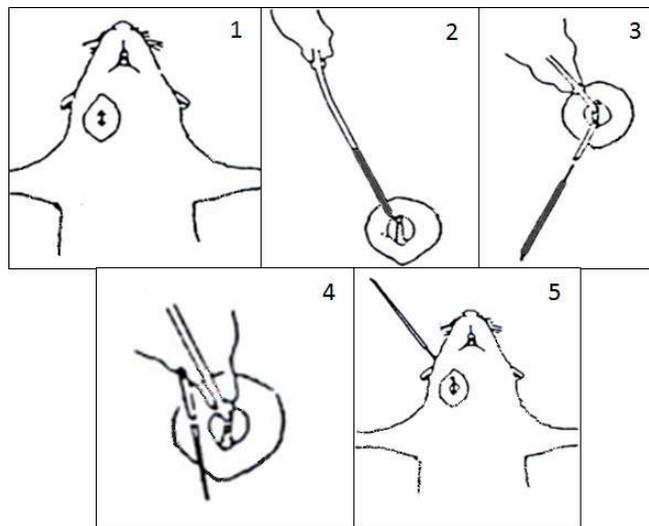
(Figura 4.9; panel 3). En este momento, se desconecta la aguja de implantación, y con la ayuda de unas pinzas de punta fina, se hace retroceder la cánula hasta que el extremo vuelva a situarse en la luz del vaso. Para comprobar que la cánula se encuentra en el interior de la vena se succiona suavemente con el émbolo de la jeringuilla, observándose en tal caso que la sangre fluye por el interior de la cánula hasta llegar a la jeringa. Se hace avanzar la cánula por el interior del vaso, hasta el punto de unión con el hilo de seda. En este momento, el extremo de la cánula introducido se encuentra en el atrio de la aurícula derecha de la rata. A continuación se fija la cánula al músculo adyacente a la zona de implantación mediante el hilo de seda que lleva unido (Figura 4.9; panel 4).

## Materiales y Métodos

Tras comprobar que el nudo para fijar la cánula no la estrangula y funciona perfectamente, se sustituye la jeringa por la aguja de exteriorización, la cual se hace pasar entre la piel y el tejido subcutáneo hasta la zona dorsal del cuello donde se extrae el extremo largo de la cánula al exterior (Figura 4.9; panel 5). A continuación se desconecta la aguja de exteriorización y se tapona con un obturador.

Finalmente, la herida practicada se desinfecta con povidona yodada al 10% y se sutura con ayuda de una aguja convencional e hilo de seda.

El tiempo habitual que se requiere para completar el proceso de canulación es inferior a 30 minutos. En la Figura 4.9 se muestran, de forma esquemática, las diversas fases de este procedimiento.



**Figura 4.9.** Representación esquemática de los principales pasos seguidos para la implantación quirúrgica de una cánula de silicona en la vena yugular derecha de la rata.

Aproximadamente 20 segundos antes del tiempo correspondiente a cada toma de muestra, se succiona, con ayuda de una jeringuilla a la que se acopla una aguja de punta roma, el suero fisiológico heparinizado que se encuentra rellenando el tubo puente y la cánula. Con esta operación se consigue que la muestra sanguínea tomada no quede diluida por el suero fisiológico contenido en dichos tubos, y también permite desechar la primera fracción de sangre, garantizando así que la muestra es lo más representativa posible.

A continuación, y coincidiendo con el tiempo de muestreo, se toma un volumen de sangre de **0.25 ml** aproximadamente, con una jeringuilla de toma de muestra que previamente ha sido heparinizada para evitar la coagulación de la sangre.

Tras la toma de muestra, se inyecta con una nueva jeringa un volumen de suero fisiológico heparinizado igual al volumen de sangre extraída (0.25 ml) con el fin de dejar limpia la cánula y el tubo puente de sangre, y reponer la volemia del animal.

#### **4.5 Experimentos. Diseño experimental.**

##### **4.5.1 Experimento 1: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica por vía subcutánea.**

Este experimento comenzó con la exposición de **30 animales** al *modelo ADE*. Transcurridas 44 semanas, un total de 25 animales cumplieron con los criterios aplicados (descritos en el epígrafe 4.3) para su inclusión en el ensayo farmacológico propiamente dicho. A partir de este momento, los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes 3 grupos experimentales, que se denominaron:

- **Grupo Vehículo:** recibieron una infusión de agua estéril (n=8).
- **Grupo DP 250:** recibieron una infusión de DP a la velocidad de 250 µg/h (n=9) durante 1 semana.
- **Grupo DP 1000:** recibieron una infusión de DP a la velocidad de 1000 µg/h (n=8) durante 1 semana.

Todas las soluciones se administraron a **velocidad constante (10 µl/h)** a partir de una **bomba Alzet® (2ML1)** implantada quirúrgicamente en el tejido subcutáneo de la rata.

El protocolo experimental empleado se resume en la siguiente figura:

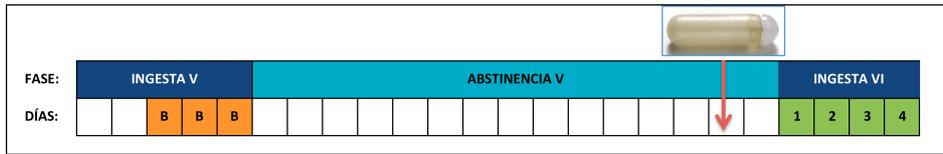


Figura 4.10. Protocolo experimental empleado en el Experimento 1.

Tal y como se puede observar, el consumo de etanol basal de cada animal se determinó a partir de la media aritmética del consumo de alcohol cuantificado cada 24 horas durante los tres últimos días de la fase de Ingesta IV (valores “B” de la figura). Los animales contaban en ese momento con un historial de consumo de aproximadamente 10 meses.

Tras la determinación de la ingesta basal se retiraron las soluciones de etanol, contando el animal únicamente con acceso a la botella de agua (*fase de abstinencia*).

**48 horas** antes de finalizar la *fase de abstinencia*, todos los animales fueron intervenidos quirúrgicamente con objeto de implantarles una bomba osmótica para la administración de los distintos tratamientos farmacológicos a ensayar.

Tras la reintroducción de las disoluciones de alcohol, se cuantificó la ingesta diaria de los diferentes fluidos de bebida con el fin de **evaluar la magnitud del ADE**. Esta ingesta, como se aprecia en la figura, se cuantificó durante los primeros 4 días post-abstinencia (Días 1, 2, 3 y 4 en la Figura 4.10).

#### **4.5.2 Experimento 2: Influencia de la DP (1000 µg/h) sobre la preferencia por una solución azucarada.**

Uno de los efectos adversos que se atribuye a la administración sistémica de DP, es su capacidad para **alterar el sentido del gusto**, es decir, influir de alguna manera en la percepción de los sabores (Font y col., 2006b). Este aspecto ha de ser obviamente investigado con el fin de que la detección de posibles efectos preventivos de la DP en la recaída puedan ser adecuadamente atribuidos a la desactivación funcional del ACD y no a su capacidad de modificar el sentido del gusto.

Así pues, el presente experimento, se diseñó con el objeto de explorar si la administración sistémica de la dosis mayor de **DP** (ver Experimento 1 de la presente memoria) provoca una **pérdida de apetencia por soluciones azucaradas normalmente bien aceptadas por la rata, lo que podría señalar una alteración en el sentido del gusto.**

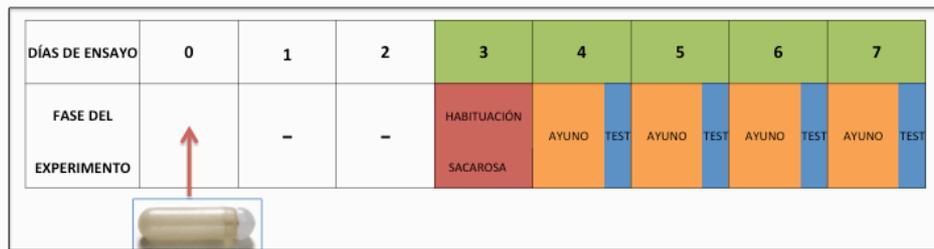
Para ello, se realizó un test de preferencia por una solución azucarada (**sacarosa al 2%**) basado en un protocolo similar descrito anteriormente por D'Aquila y colaboradores (D'Aquila y col., 1997). Simultáneamente, también se cuantificó la cantidad de comida consumida durante los 4 días que duró el ensayo.

Los animales empleados en este experimento procedían del Experimento 1. Por tanto, todos ellos contaban con un dilatado historial de consumo de etanol, sin embargo, se dejó transcurrir un periodo de no menos de 28 días para el inicio de este nuevo ensayo.

A partir de este momento, los animales se distribuyeron, de un modo aleatorio en 2 grupos experimentales:

- **Grupo DP 1000:** recibieron DP (1000 µg/h) de forma continua durante 7 días, a partir de una bomba osmótica Alzet® (2ML1) implantada en el tejido subcutáneo (n=9).
- **Grupo Vehículo:** se les administró agua estéril a partir de una bomba osmótica Alzet® (2ML1) durante 7 días (n=9).

En la siguiente figura se muestra un esquema que resume el diseño experimental empleado:



**Figura 4.11.** Protocolo experimental empleado para la ejecución del Experimento 2.

Tras la cirugía para la implantación de la bomba en el tejido subcutáneo se dejaron transcurrir 2 días para conseguir una completa recuperación de los animales.

Al tercer día de la implantación de la bomba se **habituó** a los animales a beber de una solución de sacarosa al 2%, de manera que, durante este día, los animales dispusieron únicamente de la solución azucarada como líquido de bebida.

Durante los 4 días siguientes (días 4, 5, 6 y 7 post-implantación) se cuantificó diariamente la preferencia por la solución azucarada y la cantidad de comida consumida. Durante cada uno de estos días, el animal se mantuvo 23 horas en ayuno y durante 1 hora se le presentaron dos botellas con

## *Materiales y Métodos*

líquido de bebida (agua y solución de sacarosa al 2% respectivamente) y varios pellets de comida previamente pesados. La posición de las botellas (derecha/izquierda) se alteró deliberadamente para evitar preferencias de lugar. La preferencia por la solución de sacarosa se calculó, cada día, como el cociente entre el volumen de solución de sacarosa y volumen total de líquido ingerido durante una hora y expresado en porcentaje.

La preferencia promedia de cada animal por la solución de sacarosa se presenta como la media aritmética de las cuatro mediciones realizadas.

La cantidad de comida ingerida cada día se calculó mediante diferencia de pesada entre el peso inicial de los pellets y el peso de los mismos al final del periodo de acceso (1 hora).

#### **4.5.3 Experimento 3: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración intra-VTA-p.**

El VTA-p es un pequeño núcleo del sistema mesolímbico, cuya participación se considera clave en el desarrollo de los trastornos adictivos (Ikemoto, 2010). Este experimento se ha realizado con el fin de evaluar la eficacia antirecaída de la DP tras su administración **localizada** en el **VTA-p** de la rata. Este diseño experimental nos permite además explorar:

- i) Si la reducción en el consumo de etanol por parte de la DP se puede atribuir a una alteración de la percepción de los sabores o bien a una inactivación funcional del ACD generado a nivel cerebral.
- ii) La participación de este núcleo en la acción farmacológica de la DP.

El estudio comenzó con un total de 30 animales a los que se les expuso al mismo *modelo ADE* empleado en ensayos anteriores.

Finalmente, los 24 animales que cumplieron los criterios de inclusión empleados en esta memoria (Epígrafe 4.3), se distribuyeron entre el **Experimento 3A** (implantación bilateral en el VTA-p) y **Experimento 3B** (implantación bilateral próxima, aunque deliberadamente dorsal al VTA-p).

## *Materiales y Métodos*

En ambos experimentos, la administración de la DP o el vehículo siempre se ha realizado a partir de **dos bombas Alzet® modelo 2001** (1 µl/h). Los grupos experimentales empleados fueron:

### Experimento 3A: Administración bilateral de la DP en VTA-p

Se utilizaron 14 animales que se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales:

- **Grupo Vehículo:** infusión bilateral de agua estéril (n=7).
- **Grupo DP 3:** infusión bilateral de DP (1.5 µg/h/bomba/hemisferio) (n=7).

### Experimento 3B: Administración de DP en una zona cerebral dorsal al VTA-p

Este experimento se planificó con el objeto de corroborar la especificidad de acción de la DP en VTA-p.

En este experimento, las cánulas de infusión se implantaron intencionadamente durante la cirugía, 1.5 mm dorsalmente al VTA-p.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales:

- **Grupo Vehículo:** Infusión bilateral de agua estéril (n=5).
- **Grupo DP 3:** Infusión bilateral de DP (1.5 µg/h/bomba/hemisferio) (n=5).

#### **4.5.3.1 Validación histológica.**

Una vez finalizados los experimentos, se procedió a la confirmación de la posición de la cánula mediante evaluación histológica en todos y cada uno de los animales empleados en los experimentos 3A y 3B. Se procedió al sacrificio de los animales mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico. Tras el sacrificio de los mismos, se procedió a la extracción y congelación de los cerebros a -20°C. A continuación, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 µm de espesor con la ayuda de un criostato. Estas secciones se recogieron en portaobjetos gelatinizados y se sometieron a una tinción con violeta de cresilo. Tras la tinción de los cortes, se procedió a la validación histológica de la posición de la cánula implantada a través de microscopía óptica y según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos G y col, 2007). Los criterios de aceptación empleados para garantizar que la cánula está alojada en el VTA-p han sido los descritos por el profesor Satoshi Ikemoto (Ikemoto, 2007). Las coordenadas estereotáxicas están referidas todas ellas respecto al punto bregma.

- A/P: desde -5.28 hasta -6.84 mm
- L: desde ±1.9 hasta ±2.3 mm
- V: desde -7.9 hasta -8.3 mm

#### 4.5.4 Experimento 4: Niveles de DP en plasma y tejido cerebral y eficacia antirecaída.

A tenor de los resultados obtenidos en el Experimento 1 de la presente memoria, los cuales demuestran la capacidad de la DP para prevenir las recaídas en el consumo de alcohol en los animales de ensayo, este experimento se diseñó con un doble objetivo:

- Confirmar la funcionalidad de las bombas Alzet a lo largo de todos los días de ensayo y, por tanto, corroborar la existencia de **niveles estables de DP** en el animal de experimentación en dos momentos temporales del periodo post-abstinencia: en el momento de la reintroducción del alcohol (**día 1**) y al final del periodo post-abstinencia monitorizado (**día 5**).
- **Cuantificar la concentración plasmática y en tejido cerebral** a las dos velocidades de infusión ensayadas previamente (250 y 1000 µg/h) y correlacionarlas con su eficacia farmacológica.

Todos los animales empleados se sometieron al mismo *modelo ADE* utilizado en ensayos anteriores. En este experimento, a todos los animales se les implantó el mismo modelo de bomba y bajo el mismo procedimiento utilizado en el Experimento 1. Sin embargo, existen ciertos detalles diferenciales del diseño experimental que se resumen en la siguiente ilustración (Figura 4.12).

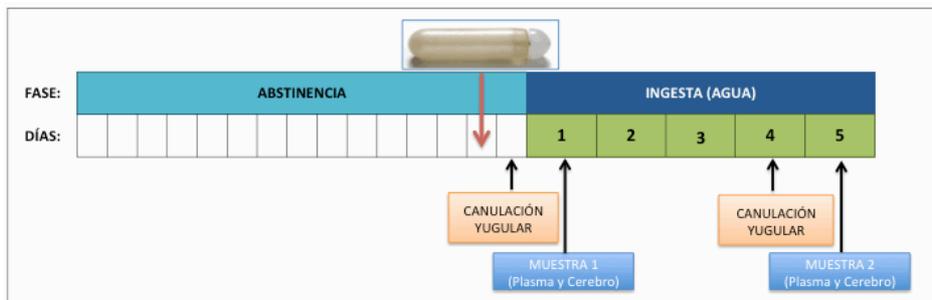


Figura 4.12. Diseño experimental empleado en el Experimento 4.

Como se puede observar, siempre se implantó una cánula en la vena yugular derecha de cada rata 24 horas antes de la toma de muestras. Esta cánula permite la toma de una muestra de sangre sin causar estrés en el animal consciente, justo antes de su sacrificio necesario para poder extraer las muestras cerebrales. Del tejido cerebral se tomaron muestras de dos regiones claramente diferenciadas: cerebro anterior y cerebro medio. El procesamiento de ambos tipos de muestras biológicas (plasmáticas y cerebrales), necesario para la posterior cuantificación de DP, se detalla en el Epígrafe 4.6.2.

Además, es importante recordar que, con objeto de evitar posibles interferencias en la disposición de la DP, en este experimento, no se reintrodujeron las soluciones de etanol, de este modo, las ratas continuaron consumiendo únicamente agua como líquido de bebida durante la fase de ingesta.

Se determinaron los niveles de DP en plasma y en tejido cerebral en dos momentos temporales diferentes:

**Muestra 1 (M1):** cuantificación de DP en plasma y tejido cerebral en el hipotético “día 1 post-abstinencia”, momento en el que la bomba lleva implantada aproximadamente 48 horas.

**Muestra 2 (M2):** cuantificación de DP en plasma y tejido cerebral en el hipotético “día 5 post-abstinencia”.

## *Materiales y Métodos*

Los 16 animales utilizados se repartieron aleatoriamente entre los siguientes grupos experimentales (n=4/grupo):

- **Grupo DP 250/M1:** animales que recibieron **DP 250  $\mu\text{g/h}$**  y que se sacrificaron para obtener la **muestra 1**.
- **Grupo DP 250/M 2:** animales que recibieron **DP 250  $\mu\text{g/h}$**  y que se sacrificaron para obtener la **muestra 2**.
- **Grupo DP 1000/M1:** animales que recibieron **DP 1000  $\mu\text{g/h}$**  y que se sacrificaron para obtener la **muestra 1**.
- **Grupo DP 1000/M2:** animales que recibieron **DP 1000  $\mu\text{g/h}$**  y que se sacrificaron para obtener la **muestra 2**.

#### **4.5.5 Experimento 5: Evaluación de la eficacia antirecaída de una terapia combinada de DP y NTX.**

Los objetivos perseguidos con la realización de este experimento son varios. En primer lugar se pretendía comprobar si la combinación DP y NTX permite mejorar los resultados obtenidos con antagonistas opioides en modelos preclínicos (Heyser y col., 2003; Holter y col., 1999). Además se intentaba averiguar si la combinación permite disminuir la dosis efectiva de DP lo que permitiría reducir la aparición de posibles efectos adversos asociados al uso de DP.

La administración de DP y de NTX se realizó empleando diferentes vías y modos de administración con objeto de i) evitar interacciones de tipo físico-químico entre ambas sustancias ii) adaptar el régimen posológico a la farmacocinética de cada sustancia, por lo cual se decidió administrar:

- **DP (250  $\mu$ g/h)** por vía subcutánea empleando una bomba osmótica Alzet® (modelo 2ML1).
- **NTX (5 mg/Kg)**, mediante inyección subcutánea en la región interescapular cada 12 horas.

El efecto antirecaída de esta terapia se evaluó cuantificando el *fenómeno ADE* en ratas Wistar sometidas a nuestro modelo.

El estudio comenzó con 25 animales, aunque finalmente se excluyeron 4 por incumplir alguno de los requisitos exigidos en el diseño empleado (ver Epígrafe 4.3).

## Materiales y Métodos

48 horas antes de finalizar el periodo de Abstinencia V, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos experimentales:

- **Grupo Vehículo:** se les administró **agua estéril** a partir de una bomba osmótica y también mediante inyección subcutánea cada 12 horas, ambas durante 6 días (n=7).
- **Grupo NTX:** se les administró **agua estéril** a partir de una bomba osmótica y **5 mg/kg** de **NTX** cada 12 horas mediante inyección subcutánea, ambas durante 6 días (n=7).
- **Grupo NTX/DP:** animales que se les administró **DP (250 µg/h)** mediante una bomba osmótica y **5 mg/Kg de NTX** cada 12 horas mediante inyección subcutánea durante 6 días (n=7).

En la siguiente figura se ilustra un resumen del protocolo experimental empleado en este estudio:



**Figura 4.13.** Protocolo experimental utilizado en el Experimento 5

Al término del último periodo de abstinencia, se reintrodujeron las diferentes disoluciones de alcohol y se cuantificó el consumo de etanol cada 24 horas con el fin de evaluar la magnitud del fenómeno ADE.

**4.5.6 Experimento 6: Determinación de los parámetros farmacocinéticos básicos de la DP en diferentes poblaciones de rata.**

**4.5.6.1 Protocolo experimental.**

A todos los animales empleados para la determinación de los parámetros farmacocinéticos básicos de la DP se les canuló la vena yugular derecha según el protocolo descrito anteriormente.

En todos los estudios farmacocinéticos realizados, la administración del fármaco se realizó mediante **inyección vía intravenosa rápida**.

La administración de las diferentes soluciones de DP siempre se ha realizado durante las 12-18 horas siguientes a la cirugía de canulación en jaulas individuales de polipropileno (425 x 266 x 185 mm). Para facilitar la administración de los preparados así como la toma de muestras se ha acoplado a la cánula implantada, el denominado por nosotros mismos como “tubo puente”, que permite la administración de los preparados y la toma de muestras de sangre, en animales completamente despiertos, con libertad de movimientos dentro de la jaula y con acceso libre al agua de bebida.

En todos los experimentos, **las muestras de sangre se tomaron a los siguientes tiempos** tras la administración de la DP: **2, 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 120 minutos**. Los procedimientos empleados para la toma de muestras de sangre así como para la cuantificación de su contenido en DP se detallan en los epígrafes 4.4.4, y 4.6, respectivamente.

Por otro lado, la terminología utilizada: *rata adolescente* (8-9 semanas de vida) y *rata adulta* (46-60 semanas de vida), se ha adoptado siguiendo las indicaciones reseñadas en la bibliografía (Andreollo y col., 2012).

Los estudios realizados con objeto de describir el comportamiento farmacocinético de la DP en ratas de diferente edad y con diferente historial de consumo de alcohol se resumen a continuación:

## *Materiales y Métodos*

- Estudio A: *Estudio de la linealidad farmacocinética de la DP en la rata adolescente sin experiencia previa en consumo de alcohol.*

Con el objeto de caracterizar la disposición de la DP en animales adolescentes que nunca han consumido alcohol, se emplearon 20 ratas macho de 8-9 semanas de vida procedentes del servicio de experimentación animal de la Universitat de València. Las ratas se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo A-2**: animales que recibieron **2 mg/kg de DP** (n=7).
- **Grupo A-10**: animales que recibieron **10 mg/kg de DP** (n=7).
- **Grupo A-30**: animales que recibieron **30 mg/kg de DP** (n=6).

- Estudio B: *Estudio de la linealidad farmacocinética de la DP en la rata adulta con un historial prolongado de consumo de etanol.*

Se emplearon 18 animales que habían estado expuestos a nuestro protocolo de alcoholización a largo plazo (mínimo 44 semanas). Los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo B-2**: animales que recibieron **2 mg/kg de DP** (n=6).
- **Grupo B-10**: animales que recibieron **10 mg/kg de DP** (n=6).
- **Grupo B-30**: animales que recibieron **30 mg/kg de DP** (n=6).

- Estudio C: *Influencia del consumo prolongado de etanol en la disposición de la DP.*

Este experimento se diseñó con objeto de estudiar la influencia que tiene un consumo prolongado de etanol en la disposición de la DP en la rata. Para este estudio se empleó un pequeño grupo de animales (n=4) mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales que sus congéneres sometidos al *modelo ADE*, pero, **sin acceso a las soluciones de etanol** (a este grupo se le ha denominado **grupo Control**).

La comparación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración de **10 mg/Kg de DP** en las ratas del **grupo Control (rata adulta/nunca ha consumido alcohol)** con los obtenidos con el **grupo B-10 (rata adulta/consumo prolongado de alcohol)**, ha permitido evaluar la influencia del factor “consumo prolongado de etanol” en la disposición de la DP.

- Estudio D: *Influencia de la edad del animal en la disposición de la DP.*

Para estudiar la influencia que tiene la edad del animal en la disposición de la DP, se han comparado los parámetros obtenidos tras la administración de **10 mg/Kg de DP en el grupo Control (rata adulta/nunca ha consumido alcohol)** con los determinados en el grupo **A-10 (rata adolescente/ nunca ha consumido alcohol)**.

#### 4.5.6.2 Métodos farmacocinéticos

La expresión matemática empleada para describir la evolución temporal de la concentración plasmática del fármaco en los animales fue la siguiente:

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha t} + B_0 \cdot e^{-\beta t} \quad (\alpha > \beta) \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son unas constantes híbridas, cuyo valor aparece en el ajustado de la ecuación matemática a las concentraciones experimentales.  $A_0$  y  $B_0$  son los correspondientes coeficientes de la ecuación exponencial.

Los valores concretos de los parámetros de la Ecuación 4.1 ( $A_0$ ,  $B_0$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ ) se obtuvieron para cada animal mediante **regresión no lineal por mínimos cuadrados**, utilizando como factor de ponderación el inverso de la concentración plasmática experimental al cuadrado (Wagner J.G, 1993).

Además, se calculó la semivida biológica en la última fase exponencial de las curvas, fase  $\beta$ , del siguiente modo:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

El área bajo la curva de niveles plasmáticos entre tiempo 0 e infinito ( $AUC_0^\infty$ ) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$AUC_0^\infty = \frac{A_0}{\alpha} + \frac{B_0}{\beta} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

El  $AUC_0^\infty$  normalizado obtenido tras la administración de la dosis ensayada con respecto a una dosis de referencia ( $AUC_0^\infty^{(N)}$ ) se calculó mediante la Ecuación 4.4:

$$AUC_0^\infty^{(N)} = \frac{AUC_0^\infty}{Dosis\ ensayada} \times Dosis\ de\ referencia \quad \text{Ecuación 4.4}$$

El aclaramiento plasmático total,  $Cl_t$ , se calculó mediante la Ecuación 4.5.

$$Cl_t = \frac{Dosis}{AUC_0^\infty} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

#### **4.6 Valoración de la DP en muestras biológicas.**

##### **4.6.1 Solución estabilizadora de DP.**

Una de las mayores complicaciones en la cuantificación de la DP es mantener este compuesto en su forma reducida y prevenir su oxidación espontánea a su forma dimerizada. Con este fin, todas las muestras biológicas deben de tratarse inmediatamente tras su obtención para estabilizar la DP presente y evitar así su oxidación. Esto se consigue, básicamente, disminuyendo el pH de las muestras. Para ello, todas las muestras biológicas obtenidas (plasma y tejido cerebral) se han hecho reaccionar con una solución estabilizadora.

La solución estabilizadora (adaptado de dos estudios previos de Bergstrom y Kreuzig (Bergstrom y col., 1981; Kreuzig y col., 1981) se ha preparado disolviendo 0.043 g de citrato de diamonio y 1 g de ácido metafosfórico, en 10 ml de agua bidestilada. La solución se renovaba semanalmente.

Siempre se ha adicionado 0.2 ml de la solución estabilizadora por cada 0.1 ml de muestra biológica. De esta forma, se consigue además de evitar la oxidación espontánea de la DP, precipitar las proteínas presentes en la muestra, paso necesario para su cuantificación mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC).

#### **4.6.2 Preparación y toma de muestras.**

Se ha procedido a cuantificar el contenido de DP en muestras biológicas procedentes de los siguientes experimentos:

- Experimento 4: correlación entre los niveles de DP en plasma y tejido cerebral frente a su eficacia antirecaída.
- Experimento 6: estudio farmacocinético de la DP tras su administración intravenosa en diferentes poblaciones de rata.

##### *Muestras plasmáticas*

La muestra de sangre obtenida, a través de la cánula implantada en la vena yugular, se deposita en un tubo tipo "Eppendorf" y se centrifuga a una velocidad de 12000 rpm durante 3 minutos. Con una micropipeta se toma un volumen adecuado del plasma sobrenadante y se deposita dentro de otro tubo tipo "Eppendorf" nuevo donde se ha añadido previamente y en la proporción adecuada la *solución estabilizadora*. Con la ayuda de un Vortex se somete la muestra a agitación intensa (5-10 segundos). A continuación, se procede a su centrifugación (12000 rpm durante 3 minutos) para obtener el sobrenadante, que se deposita en un nuevo tubo tipo "Eppendorf" que se conserva en la nevera a 4°C hasta su valoración.

## *Materiales y Métodos*

### *Muestras de tejido cerebral:*

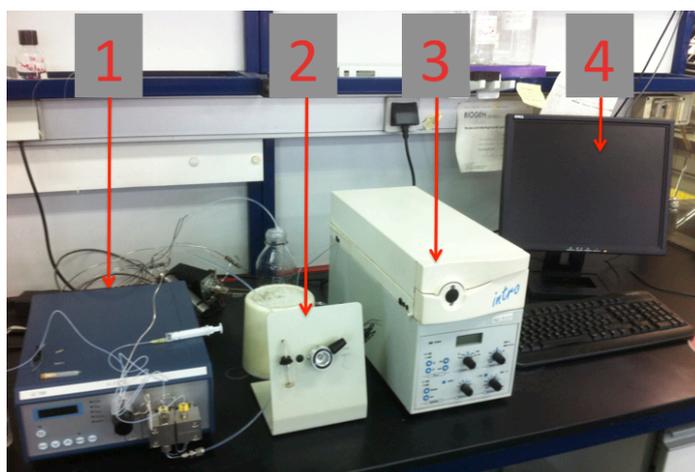
Inmediatamente después de tomar la muestra de sangre de las ratas del Experimento 4, el animal se sacrifica con objeto de extraer su encéfalo, del que se toman muestras de dos regiones cerebrales diferenciadas: cerebro anterior y cerebro medio. A continuación, cada muestra de tejido cerebral se pesa y se deposita en un tubo de ensayo. Por cada gramo de tejido de muestra, se adiciona 1.5 ml de *líquido de homogenización*. El *líquido de homogenización* empleado se compone de una mezcla de suero fisiológico y *solución estabilizadora* (1:2). A continuación, se homogeneiza el contenido del tubo de ensayo (tejido cerebral + líquido de homogenización) durante 5-10 segundos con la ayuda de un homogeneizador modelo UltraTurrax T-25 Basic. Seguidamente, se introduce el homogeneizado en un tubo Eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a 13200 rpm y una temperatura de 4°C. Finalmente, se procede a la valoración mediante HPLC del contenido de DP en el líquido sobrenadante.

#### 4.6.3 Condiciones cromatográficas.

La valoración del contenido de DP en muestras de plasma y tejido cerebral, se ha realizado mediante cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) y detección electroquímica.

El sistema cromatográfico utilizado está constituido por los siguientes elementos:

- Bomba isocrática “Alexys Lc 100” (Antec, Leyden, Holanda).
- Inyector “Rheodyne” de volumen de inyección variable.
- Fase estacionaria: columna modelo Kinetex 2.6u C18 100A (Phenomenex; Torrance, California, USA).
- Detector electroquímico (modelo “Intro”, Antec, Leyden, Holanda) provisto con una célula ISAAC (Antec, Leyden, Holanda).
- Software para integración de cromatogramas (Azur 4.2, Datalys Francia).



**Figura 4.14.** Fotografía del sistema cromatográfico empleado: 1: bomba isocrática; 2: Inyector “Rheodyne”; 3: Detector electroquímico; 4: Unidad central de procesamiento con software para la gestión de integración de los cromatogramas.

## *Materiales y Métodos*

Como **fase estacionaria** se ha empleado un sistema de fase inversa constituido por una columna modelo Kinetex C<sub>18</sub> suministrada por la casa comercial Phenomenex, de 100 mm de longitud y 2.1 mm de diámetro interno y rellena de sustrato pelicular silíceo con grupos de 18 átomos de carbono, cuyo tamaño de partícula es de 2.6 µm.

La **fase móvil** se ha preparado a partir de una solución tampón de citrato amónico 0.02 M de pH= 3.1 ó 3.53 (para muestras de tejido cerebral o muestras plasmáticas respectivamente), a la que se le ha añadido ácido octanosulfónico 4.52 g/L y NaCl 0.117 g/L. Posteriormente dicha fase se ha filtrado a través de filtros de nylon "Osmonics" (Minnetonka, Minnesota) de 0.45 µm de diámetro de poro, con ayuda de un dispositivo de filtración por vacío, con objeto de desgasificar y eliminar las partículas sólidas presentes en la misma.

Siempre se ha empleado un flujo de elución de la fase móvil de 0.1 ml/min, soportando el sistema una presión máxima de 2300 psi. El volumen de muestra inyectado siempre ha sido de 5 µl y se ha detectado electroquímicamente la DP empleando un potencial de oxidación de +0.8 nA/v.

#### **4.6.4 Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión.**

Para comprobar la **linealidad del método analítico** se prepararon 3 rectas de calibración con cinco patrones de DP en plasma de concentración 0.5, 1, 2, 4 y 16 µg/ml. Los resultados obtenidos después de la valoración de estos patrones mostraron una excelente linealidad en función de la concentración de DP.

Para la **evaluación de la exactitud y la reproducibilidad** del método analítico, se prepararon cinco soluciones patrón de DP a las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 4 y 16 µg/ml. Cada patrón se valoró por triplicado como si se tratase de una muestra de concentración desconocida. Los valores de concentración de DP se calcularon interpolando los valores de área obtenidos en las correspondientes rectas de calibración. Se promediaron los valores de concentración calculados para cada patrón y se determinó el coeficiente de variación. La desviación del valor medio respecto del teórico es indicativa de la exactitud, mientras que el coeficiente de variación lo es de la precisión.

La determinación de la concentración de DP en las muestras plasmáticas se realizó mediante la interpolación del valor del área obtenido para cada muestra en las rectas de calibración, preparadas según se ha descrito, el mismo día de la determinación analítica.

#### **4.7 Expresión de resultados y análisis estadístico.**

Todos los **resultados** que se presentan en esta memoria se han expresado como **media  $\pm$  error estándar**, con la excepción de los obtenidos en el Experimento 6, que se han expresado como **media  $\pm$  desviación estándar**.

En **todos los análisis estadísticos** realizados se ha fijado un **nivel de confianza del 95%**, de modo que existen diferencias significativas cuando el valor de la probabilidad **P es menor del 5%**.

##### **4.7.1 Caracterización del protocolo de alcoholización a largo plazo con fases repetidas de abstinencia.**

Con objeto de caracterizar la pauta de ingesta de etanol en los animales de nuestra colonia y validar el modelo experimental empleado, se han analizado (en una muestra de 25 animales) el conjunto de variables que se describe a continuación:

Los valores de **ingesta de alcohol** se han expresado como gramos de etanol consumido por kilogramo de peso del animal y por día (g/kg/día).

El **consumo basal** de etanol mostrado por cada animal se ha calculado haciendo la media aritmética de la ingesta de etanol (g/kg/día) cada 24 horas durante los tres días previos a cada periodo de abstinencia. Aunque el consumo basal de alcohol no se ha manejado como una variable de análisis, ha sido necesario su estimación para poder identificar la aparición del fenómeno de la recaída (fenómeno ADE).

La **preferencia el etanol**, se calcula como el cociente del volumen total consumido de las tres soluciones etanólicas y el volumen total de líquidos consumidos (agua + soluciones etanólicas) cada 24 horas. El resultado de este cociente se expresa en forma de porcentaje.

Adicionalmente, se ha analizado la **preferencia por cada una de las diferentes soluciones de etanol** ofrecidas al animal. Esta preferencia, se calcula como el cociente del volumen consumido de cada una de las tres disoluciones de etanol (5%, 10% ó 20%) y el volumen total de etanol consumido (la suma de las tres disoluciones) cada 24 horas. El resultado de este cociente se expresa en forma de porcentaje.

Como una caracterización adicional del *modelo ADE*, se han determinado las **concentraciones de etanol en plasma** alcanzadas tras la exposición de los animales a este protocolo. Estos valores se expresan como miligramos de etanol por cada 100 ml de plasma (mg/dl).

Para caracterizar el procedimiento experimental se ha utilizado un ANOVA de dos vías con medias repetidas en ambos para analizar los factores *tiempo* y el *nº de ADE*. Este análisis se ha aplicado sobre las variables: **ocurrencia del fenómeno ADE** (medido a través de la ingesta de etanol), **preferencia total por el etanol** y **preferencia por cada una de las disoluciones de alcohol** ofrecidas. Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de varianza, se ha procedido a la aplicación del test de comparación múltiple de Bonferroni. Ocasionalmente, ante la ausencia de significación estadística en la interacción de los factores analizados, se ha procedido al análisis de los resultados obtenidos mediante un ANOVA de una vía de medidas repetidas.

#### **4.7.2 Experimentos 1, 3 y 5.**

Todas las variables analizadas en los experimentos 1, 3 y 5 se han cuantificado en la misma ventana temporal: final del periodo de *ingesta IV* y comienzo del periodo de *ingesta V*. En todos estos experimentos se han registrado las variables: **ingesta de alcohol** (expresado en gramos de etanol/kg/día), **preferencia total por el etanol** (expresado en %), **volumen total de líquido** consumido por día (suma de los volúmenes consumidos de las cuatro botellas; expresado en ml) y **peso corporal** de los animales determinado antes y después de la administración del tratamiento farmacológico (expresado en kg).

El efecto de la DP, tras su administración sistémica (Experimento 1), tras su administración intra-VTA-p (Experimento 3), así como el efecto de la terapia combinada NTX/DP (Experimento 5) en: (A) el peso corporal de los animales, (B) la aparición del fenómeno ADE, (C) la preferencia por las soluciones de etanol y (D) el volumen total de líquido consumido se ha analizado mediante un ANOVA mixto, siendo el factor entre-sujetos el *tratamiento* y el factor intra-sujetos el *tiempo*.

Además, con objeto de descartar la posible existencia de algún tipo de efecto post-quirúrgico no controlado que pudiera modificar el patrón habitual de consumo de alcohol en los animales, se ha analizado y comparado la ingesta de etanol en los animales pertenecientes al *grupo vehículo* en el 4º y el 5º ADE. Este estudio comparativo se ha realizado aplicando un análisis de varianza de dos vías con medidas repetidas en ambas, siendo los factores analizados el *tiempo* y el *número de ADE*.

Independientemente del tipo de análisis de varianza realizado, cuando se han detectado diferencias significativas, se ha procedido a la aplicación del test de comparación múltiple de Bonferroni. Ocasionalmente, ante la ausencia de significación estadística en la interacción de los factores

analizados, se ha procedido al análisis de los resultados obtenidos mediante un ANOVA de una vía de medidas repetidas.

#### **4.7.3 Experimento 2.**

En este experimento, la **preferencia por la solución de sacarosa** se ha calculado como el cociente entre el volumen de solución de sacarosa y el volumen total de líquido consumidos durante la hora que dura el ensayo. El valor de este cociente se ha expresado en porcentaje.

Además, también se ha cuantificado la **cantidad de comida** sólida consumida por parte de cada animal durante la hora que dura el ensayo. Esta cantidad se calcula, como comentamos, por diferencia entre la masa inicial y la masa final de los pellets de pienso presentes en la jaula. El valor obtenido se expresa en gramos de pienso.

Tanto la **preferencia promedia por la solución de sacarosa** como la **ingesta de comida** en cada sujeto se han calculado a partir de las mediciones realizadas durante los 4 días de ensayo.

La comparación estadística entre los valores obtenidos, en el grupo tratado y el no tratado con DP se ha realizado mediante una t de Student para datos no apareados.

#### 4.7.4 Experimento 4.

En este experimento, se muestran las concentraciones de DP en plasma (expresadas en  $\mu\text{g/ml}$ ) y en dos regiones cerebrales (expresadas en  $\mu\text{g/g}$  de tejido) obtenidas en dos momentos temporales diferentes del experimento (Muestra 1 y Muestra 2). Adicionalmente, se presenta, expresada en porcentaje, la relación entre la concentración del fármaco presente en el tejido cerebral y su correspondiente concentración plasmática.

La comparación estadística entre los niveles plasmáticos y cerebrales de DP se ha realizado mediante una t de Student para datos no apareados.

#### 4.7.5 Experimento 6.

A partir de las curvas de nivel plasmático promedias obtenidas para los diversos grupos experimentales se han calculado los parámetros farmacocinéticos más comunes (el cálculo de cada uno de ellos se describe en el epígrafe de *métodos farmacocinéticos* (4.5.6.2). Los parámetros farmacocinéticos de la DP que se presentan en esta memoria junto con las unidades empleadas se resumen en la siguiente tabla.

$A_0$	$B_0$	$\alpha$	$\beta$	$t_{1/2}$	Cl <sub>r</sub>	$AUC_0^{\infty}$	$AUC_0^{\infty(N)}$
$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\text{min}^{-1}$	$\text{min}^{-1}$	min	ml/min	$\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$	$\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$

**Tabla 4.4.** Resumen de los diferentes parámetros farmacocinéticos de la DP junto a sus correspondientes unidades empleados en el Experimento 6.

La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en los distintos grupos de experimentales de estudio se ha realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas.

**4.7.6 Métodos matemáticos y estadísticos: programas informáticos empleados.**

Las distintas pruebas paramétricas de **comparación de medias** intra o inter-sujetos se han realizado con la ayuda del programa informático *SPSS 17.0*.

Para determinar los **parámetros de las rectas de calibración**, se ha empleado el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados (SAUNDERS y TRAPP, 1994) y, de nuevo, el programa informático utilizado ha sido el *SPSS 17.0*.

Para ajustar la **ecuación matemática teórica** a los datos de concentración plasmática-tiempo obtenidos tras la administración intravenosa rápida, se ha utilizado un programa informático, *Sigmaplot 10.0*, que permite la realización de regresión no lineal por mínimos cuadrados, que emplea el algoritmo de Marquadt-Levenberg. Los ajustados se han llevado a cabo utilizando como factor de ponderación  $w_i = 1/Y^2$ , expresión en la que Y representa los valores experimentales de concentración plasmática.



## 5 RESULTADOS

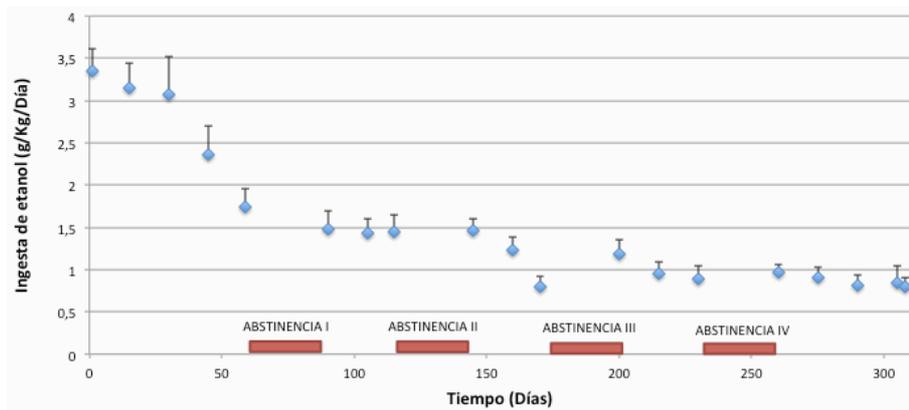


### 5.1 Caracterización del modelo experimental empleado: protocolo de alcoholización a largo plazo con fases repetidas de abstinencia.

El modelo experimental empleado en la presente memoria (el cual hemos denominado *modelo ADE*), pretende reproducir el fenómeno de la recaída en el consumo de alcohol que se produce en pacientes dependientes al alcohol cuando reinician de nuevo el consumo de la droga tras un periodo de abstinencia. Se trata de un protocolo ampliamente utilizado y validado en la literatura (Le y col., 2002b; Sanchis-Segura y col., 2006; Spanagel y col., 1999). No obstante, puesto que este protocolo se ha modificado para adaptarlo a nuestras condiciones de trabajo, se ha procedido a su caracterización. Para ello, se ha utilizado una **muestra representativa de 25 animales**.

En la figura 5.1. se resumen los valores del **consumo de etanol** de los animales seleccionados durante las primeras **44 semanas**. Con objeto de simplificar esta figura, se han representado los valores medios del consumo de etanol, agrupados en periodos de 2 semanas. Además, **no** se han representado los valores de consumo de alcohol inmediatamente después de la reintroducción de las soluciones de etanol. Esta gráfica permite observar la evolución de la **ingesta basal de etanol** de nuestra colonia de animales a lo largo de 44 semanas que duró el procedimiento.

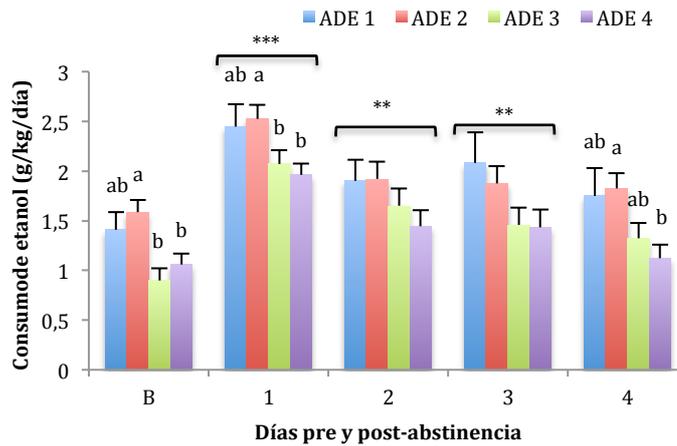
## Resultados



**Figura 5.1.** Ingesta promedio de etanol ( $\pm$  e.e ), expresada en g/kg/día, de los animales utilizados en la caracterización del modelo experimental (n=25). Los valores de ingesta representados se han agrupado en periodos de 2 semanas. Las barras de color rojo representadas sobre el eje de abscisas se corresponden con cada una de las fases de abstinencia.

Como se puede observar, el consumo basal de etanol disminuye de forma muy acusada durante la Fase de Ingesta I y va descendiendo progresivamente a medida que aumenta el tiempo total de exposición al alcohol. Finalmente se alcanza un valor asintótico de aproximadamente 1 g/kg/día durante la Fase de Ingesta IV.

En la Figura 5.2. se resumen los valores promedio de consumo de etanol (g/kg/día) durante los 3 días previos a cada fase de abstinencia (consumo basal) y durante los cuatro días posteriores a la reintroducción de las soluciones alcohólicas (Días 1, 2, 3, 4 post-abstinencia), a lo largo de las cuatro fases de privación a las que han sido sometidos los animales (ADE 1, ADE 2, ADE 3 y ADE 4) previas al tratamiento farmacológico.

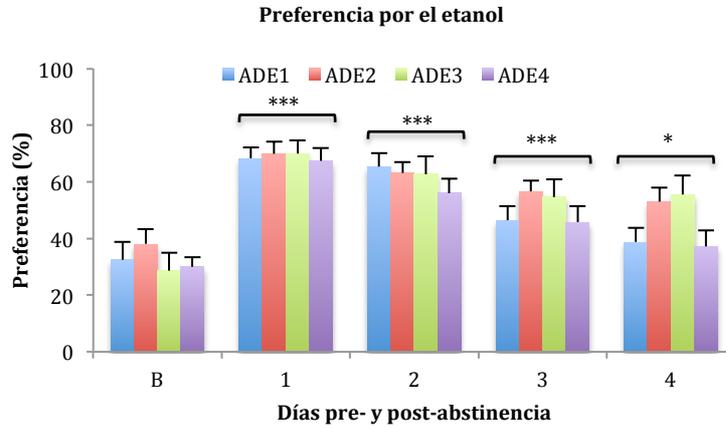


**Figura 5.2. Consumo de etanol (g/kg/día)** en los animales seleccionados para la caracterización del modelo experimental (n=25). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al consumo basal (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001) detectadas en la prueba de comparación múltiple realizada tras colapsar los datos de los diferentes ADEs para cada día post-abstinencia. Las diferentes *letras* (a, b, ab) indican diferencias estadísticamente significativas en el consumo de etanol entre los diferentes ADEs experimentados, diferencias que se han identificado tras la realización adicional de 5 ANOVAs de una vía (uno por cada día: (B) y los 4 días post-abstinencia) (p<0.05).

## Resultados

A tenor de los resultados obtenidos, se aprecia que los animales sometidos al modelo experimental empleado manifiestan el *fenómeno ADE* de forma robusta y reproducible. Como se puede observar, existe un incremento temporal en el consumo de etanol tras cada periodo de abstinencia. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías de medidas repetidas) confirmó esa observación. Este análisis reveló la existencia de un efecto significativo en el factor *tiempo* ( $F(4,84)=35.887$ ;  $p<10^{-4}$ ) lo cual confirma la existencia del *fenómeno ADE*. Este incremento en el consumo de etanol se prolongó hasta el tercer día post-abstinencia. Aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la interacción *tiempo x número de ADE* ( $F(12,252)=0.654$ ;  $p=0.794$ ), curiosamente sí se identificó un efecto *número de ADE* significativo ( $F(3,63)=4.874$ ;  $p=0.004$ ). Por ello, para poder comparar el consumo de etanol entre los diferentes *ADEs* en condiciones basales y para cada día post-abstinencia del experimento, se realizaron 5 ANOVAs de 1 vía de medidas repetidas (uno para el basal y por cada día post-abstinencia), siendo en este caso el *número de ADE* el factor analizado. Las diferencias observadas entre los diferentes *ADEs* ensayados, se explican por el progresivo descenso en el consumo de alcohol mostrado por los animales a lo largo de todo el procedimiento experimental (ver Figura 5.1). En cualquier caso, no se detectaron diferencias significativas entre el ADE 3 y el ADE 4 para ninguno de los 4 días post-abstinencia. Es decir, una vez experimentados varios episodios de abstinencia (2 en nuestras condiciones experimentales) y tras un tiempo prolongado de exposición al alcohol, los animales manifiestan un *fenómeno ADE* reproducible.

En la Figura 5.3 se resumen los valores promedio de preferencia por el etanol antes de la fase de privación (preferencia basal) y durante los cuatro días siguientes al periodo de abstinencia (días post-abstinencia 1, 2, 3 y 4) determinadas durante los cuatro periodos de abstinencia ensayados (ADE 1, ADE 2, ADE 3 y ADE 4).

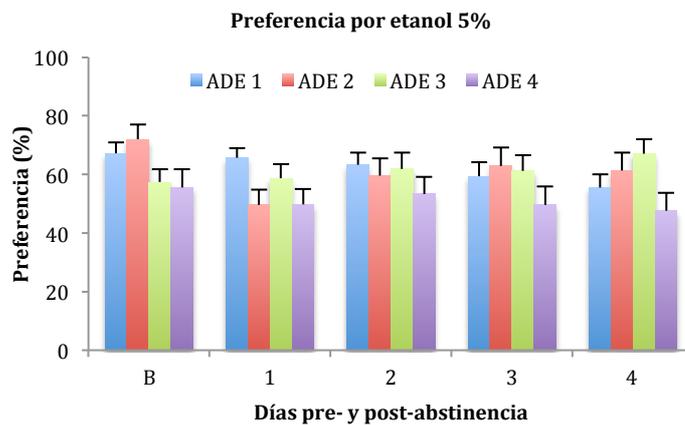


**Figura 5.3. Preferencia por el etanol** (expresado en porcentaje) con respecto al volumen total de líquido consumido en los animales seleccionados para la caracterización del protocolo experimental (n=25). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa la preferencia basal media por el etanol medida en los 3 días pre-abstinencia. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al consumo basal (\*p<0.05; \*\*\*p<0.001) detectadas en la prueba de comparación múltiple realizada tras colapsar los datos de los diferentes ADEs para cada día post-abstinencia.

## Resultados

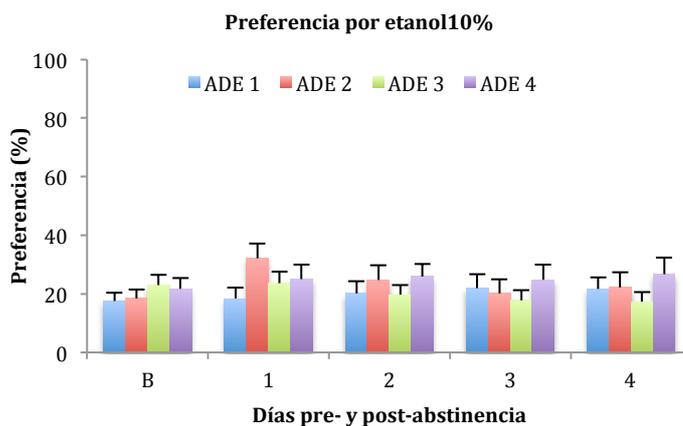
No se detectaron diferencias significativas ni en la interacción *tiempo x número de ADE* ( $F(12,252)=1.476$ ;  $p=0.133$ ), ni en el efecto *número de ADE* ( $F(3,63)=1,383$ ;  $p=0.256$ ). El ANOVA únicamente identificó la existencia de un efecto *tiempo* estadísticamente significativo ( $F(4,84)=44.841$ ;  $p<10^{-4}$ ) asociado a la existencia del fenómeno de recaída. Por tanto, el análisis estadístico demostró que la preferencia basal por el etanol no se modificó entre los distintos ADEs experimentados. El análisis de comparación múltiple confirmó que la preferencia por el etanol aumentó significativamente con respecto a la preferencia basal, durante los cuatro días post-abstinencia. En términos generales la preferencia por el etanol pasó aproximadamente desde el 30% antes de la fase de privación hasta valores cercanos al 70% durante los días post-abstinencia. **Estos datos ponen de manifiesto que los animales, tras la reintroducción de las soluciones de etanol modifican su patrón habitual de consumo, incrementando la proporción de etanol consumido con respecto al volumen total de líquidos. Es decir, que de forma temporal consumen proporcionalmente mucho más alcohol que en condiciones normales.**

Adicionalmente, en las Figuras 5.4 a 5.6 se resume las preferencias mostradas por las diferentes soluciones de etanol ofrecidas (5%, 10% y 20%). En estas figuras se representa la preferencia por cada solución de etanol en el periodo basal y después de cada periodo de abstinencia durante los cuatro ADEs experimentados.

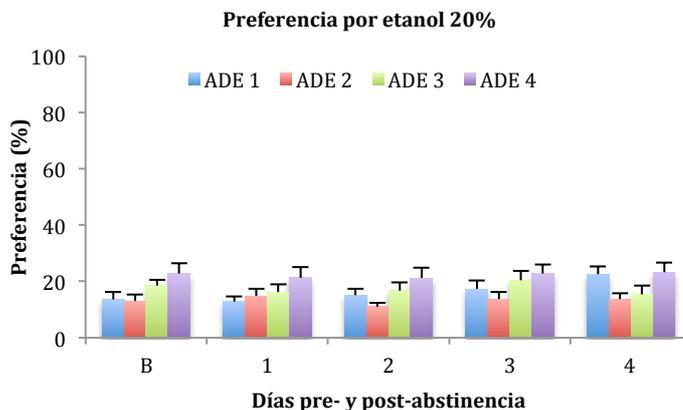


**Figura 5.4. Preferencia** (expresada en porcentaje) por la solución de **etanol 5%** con respecto al etanol total consumido en los animales seleccionados para la caracterización del protocolo experimental (n=25). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa preferencia basal por el etanol y se corresponde con la preferencia media en los 3 días pre-abstinencia.

## Resultados



**Figura 5.5. Preferencia** (expresada en porcentaje) por la solución de **etanol 10%** con respecto al etanol total consumido en los animales seleccionados para la caracterización del protocolo experimental (n=25). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa la preferencia basal media por el etanol en los 3 días pre-abstinencia.



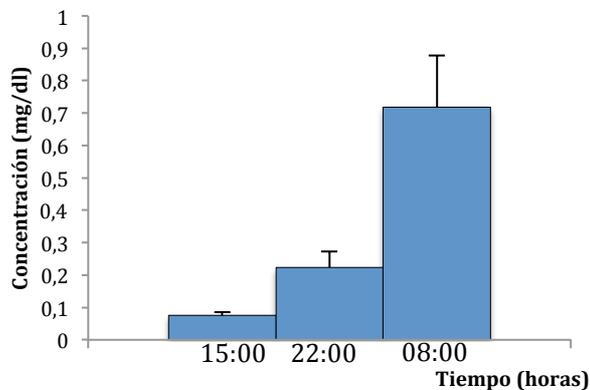
**Figura 5.6. Preferencia** (expresada en porcentaje) por la solución de **etanol 20%** con respecto al etanol total consumido en los animales seleccionados para la caracterización del protocolo experimental (n=25). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa la preferencia basal media por el etanol en los 3 días pre-abstinencia.

La inspección de estas tres figuras correspondientes a la preferencia por cada una de las soluciones etanólicas, demuestra que no se produjeron cambios significativos en las preferencias por las diferentes soluciones de etanol ni entre los días pre- y post-abstinencia, ni entre los cuatro ADEs experimentados. En general, se observa que los animales prefieren beber de la solución de etanol al 5% (aproximadamente entre el 50 y el 70%) a lo largo de los diversos ADEs ensayados. Por el contrario la preferencia por las soluciones al 10% y al 20% es apreciablemente menor, situándose en torno al 20% y al 15%, respectivamente.

El análisis estadístico confirmó que, la preferencia por la solución de etanol al 5% y 10% no cambió significativamente ni a lo largo del *tiempo* ( $F(4,84)=1.978$ ;  $p=0.105$ ) y ( $F(4,84)=1.456$ ;  $p=0.223$ ) ni entre los diferentes ADEs ( $F(3,63)=2.153$ ;  $p=0.102$ ) y ( $F(3,63)=0.860$ ;  $p=0.466$ ), respectivamente. En el análisis estadístico de la preferencia por la solución de etanol al 20% no se detectaron diferencias en el efecto *tiempo* ( $F(4,84)=1.207$ ;  $p=0.314$ ), aunque sí se identificó significación estadística en el efecto *número de ADE* ( $F(3,63)=3.604$ ;  $p=0.018$ ). El análisis de comparación múltiple sólo detectó la existencia de diferencias significativas al colapsar los valores del ADE 2 y el ADE 3. **Por tanto, a la luz de los resultados obtenidos, se puede afirmar que la preferencia por las diferentes soluciones de etanol se ha mantenido invariable en términos generales a lo largo de los cuatro ADEs previos al tratamiento.**

## Resultados

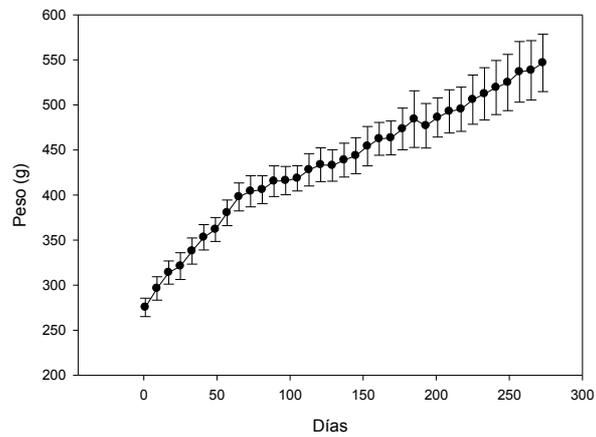
También se determinaron los niveles de etanol alcanzados en el plasma de los animales expuestos a nuestro modelo experimental. En la siguiente figura, se representan los valores de concentración plasmática promedio del etanol cuantificados en tres momentos temporales del día.



**Figura 5.7. Concentración de etanol en plasma** (expresado en mg/dl). Los datos se presentan como media ± e.e (n=6).

Los resultados obtenidos muestran la existencia de niveles medibles de etanol en el plasma de los animales expuestos a nuestro modelo experimental independientemente de la hora de muestreo. Además, tal y como se puede apreciar, los niveles plasmáticos más bajos se han cuantificado durante el ciclo de luz (15:00), presentando un valor de  $0.075 \pm 0.01$  mg/dl. Dado que las luces del animalario se apagan a las 20:00 horas, transcurridas 2 horas se cuantificaron niveles plasmáticos mayores ( $0.224 \pm 0.05$  mg/dl), obteniéndose el máximo valor a las 8:00 de la mañana ( $0.720 \pm 0.15$  mg/dl), justo al final del ciclo de oscuridad. Estos datos sugieren que el consumo de alcohol por parte de la rata se produce mayoritariamente durante la fase de oscuridad de su ciclo.

Finalmente, para confirmar que el crecimiento de los animales fue adecuado a pesar de la ingesta continuada de etanol, se hizo un seguimiento de su peso. En la gráfica que se muestra a continuación se presenta la evolución temporal de los pesos medios semanales del grupo de animales con los que se ha llevado a cabo la caracterización del modelo.

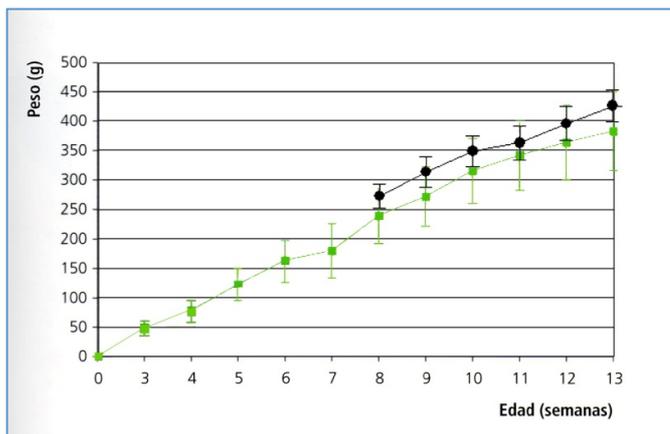


**Figura 5.8. Estudio del peso medio semanal de los animales** (expresado en g) durante el procedimiento de alcoholización a largo plazo empleado en la presente memoria. Los datos se presentan en forma de media  $\pm$  e.e (n=25).

## Resultados

Adicionalmente, los valores de peso registrados en nuestro estudio se han representado sobre una curva de crecimiento en animales mantenidos en condiciones normales (obviamente no ingieren etanol) proporcionada por la casa comercial Harlan Laboratories, Inc (Indianápolis).

Los resultados representados comienzan en la 8<sup>a</sup> semana de vida, puesto que ésta fue la edad con la que ingresaron en este estudio.

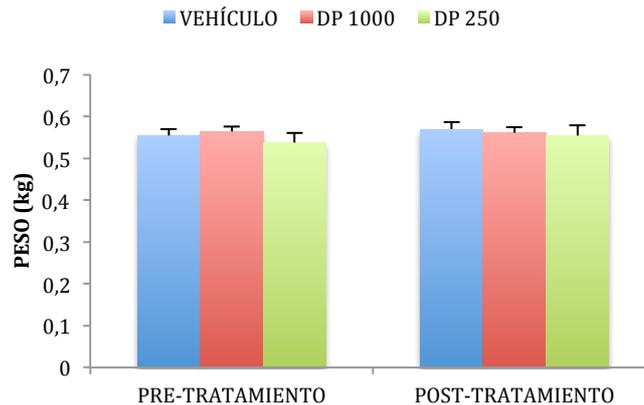


**Figura 5.9. Peso promedio de los animales** (expresado en g) durante el procedimiento de alcoholización a largo plazo empleado en la presente memoria (círculos negros) y peso promedio de la rata Wistar macho, proporcionados por la casa comercial Harlan Laboratories, Inc (cuadros verdes). Los datos experimentales se presentan en forma de media  $\pm$ e.e.

Como se observa en la figura, el crecimiento de los animales de nuestro grupo experimental sigue una evolución similar a la observada en los animales de la casa Harlan<sup>®</sup>, por lo que se puede deducir que **la ingesta continuada de etanol no alteró, a priori, el peso de las ratas.**

## 5.2 Experimento 1: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica por vía subcutánea.

En la Figura 5.10 se representan los valores promedio, junto a su error estándar, del **peso de los animales** de cada grupo experimental determinados antes y después de recibir el tratamiento farmacológico.

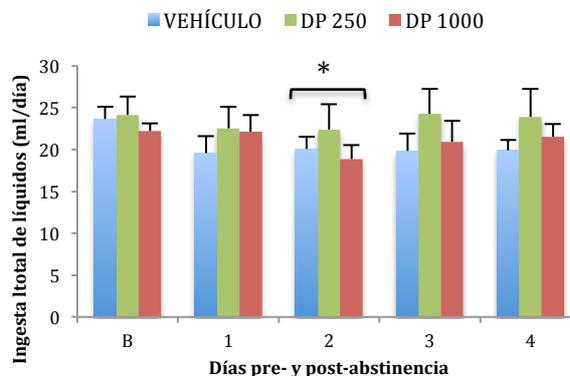


**Figura 5.10. Peso corporal** (expresado en kg) determinado la semana previa y la semana posterior a la implantación quirúrgica de la bomba osmótica Alzet® en los animales empleados en el Experimento 1.

El análisis de varianza mixto no detectó variaciones significativas en el peso de los animales ni a lo largo del *tiempo* ( $F(1,21)=3.313;p=0.085$ ), ni entre los distintos *tratamientos* ( $F(2,21)=0.199;p=0.821$ ). La interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(2,21)=1.484;p=0.252$ ) tampoco mostró diferencias significativas. Es decir, **la administración sistémica de DP (250  $\mu\text{g/h}$  ó 1000  $\mu\text{g/h}$ ) no produjo cambios significativos en peso de los animales tratados.**

## Resultados

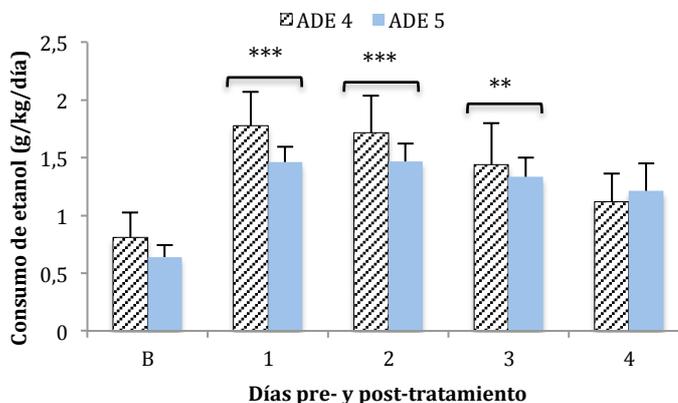
En la Figura 5.11 se representan los valores promedio de consumo total de líquidos (expresado en ml) de los animales tratados con DP (250 µg/h ó 1000 µg/h) o vehículo, tras el quinto periodo de abstinencia.



**Figura 5.11. Ingesta total de líquidos (ml/día)** de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la administración por vía sistémica de vehículo (n=8), DP 250 µg/h (n=9) o DP 1000 µg/h (n=8). Los datos se presentan como media ± e.e; "B" representa la ingesta basal de líquidos y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* denotan diferencias significativas con respecto a la ingesta de líquidos basal (\*p<0.05). En este caso, el test de comparación múltiple se ha realizado colapsando los tres grupos ensayados a cada tiempo experimental.

El análisis estadístico (ANOVA mixto) realizado sobre los valores de ingesta líquida total no detectó diferencias significativas ni en el efecto *tratamiento* ( $F(2,22)=0,346$ ;  $p=0,711$ ) ni en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,88)=1.012$ ;  $p=0.433$ ). Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas a lo largo del *tiempo* ( $F(4,88)=2,851$ ;  $p=0,028$ ). El test de comparación múltiple, realizado, colapsando los tres grupos ensayados a cada tiempo experimental, sólo detectó significación entre el consumo basal y el cuantificado el día 2 post-abstinencia. Con objeto de descartar que la intervención quirúrgica pudiera tener algún efecto sobre la ingesta voluntaria de líquidos en el animal, se analizó el consumo total de líquidos durante el ADE 5 en el grupo vehículo mediante un ANOVA de una vía de medidas repetidas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ( $F(4,28)=1.819$ ;  $p=0.153$ ).

Adicionalmente, para confirmar que el efecto de la cirugía no afecta a la magnitud del fenómeno ADE, también se ha analizado, mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas en ambas, el consumo de etanol de los animales del grupo vehículo durante el ADE 4 (sin cirugía) y el ADE 5 (con cirugía) (Figura 5.12).

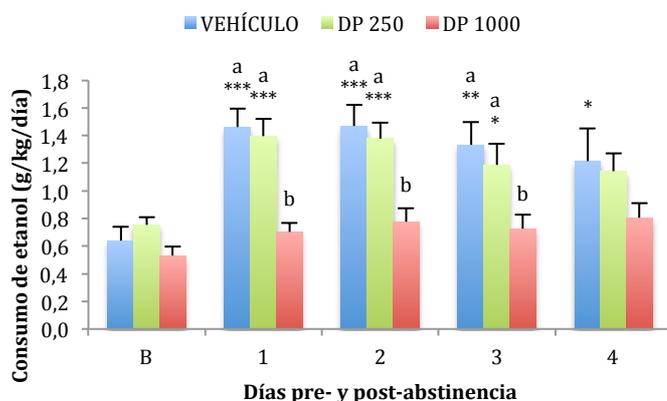


**Figura 5.12. Consumo de etanol (g/kg/día)** de los animales del grupo vehículo sujetos al modelo ADE durante el cuarto (barras rayadas) y el quinto (barras azules) periodo de post-abstinencia (n=8). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al consumo basal (\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). El test de comparación múltiple se ha realizado colapsando los dos grupos ensayados a cada tiempo experimental.

Como se puede observar en la Figura 5.12, tanto el perfil como la magnitud del fenómeno ADE en el grupo vehículo tras el quinto periodo de abstinencia (ADE 5) son superponibles a los observados tras el periodo de abstinencia anterior (ADE 4) donde los animales no habían sido sometidos a ningún tipo de cirugía. El análisis estadístico confirmó esta observación y no mostró diferencias significativas ni entre los distintos ADEs ( $F(4,56)=0.682$ ;  $p=0.607$ ) ni en la interacción tiempo  $\times$  número ADE ( $F(1,14)=0.580$ ;  $p=0.459$ ). Sí se detectaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $F(4,56)=15.175$ ;  $p<10^{-4}$ ) confirmando que, tras ambos periodos de abstinencia apareció un incremento en el consumo de alcohol característico del fenómeno ADE.

## Resultados

Tras estas consideraciones iniciales, se ha procedido a evaluar la eficacia farmacológica de la DP en la prevención de la recaída en el consumo de etanol. En la siguiente figura 5.14 se representan gráficamente los valores promedio de consumo de etanol en los animales tratados con DP (250 µg/h ó 1000 µg/h) o con vehículo tras el quinto periodo de abstinencia. El ANOVA mixto de medidas repetidas ha mostrado la existencia de diferencias significativas tanto en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,88)=2.242$ ;  $p=0.031$ ), como en el efecto *tiempo* ( $F(4,88)=19.009$ ;  $p<10^{-4}$ ) y el efecto *tratamiento* ( $F(2,22)=8.138$ ;  $p=0.002$ ).

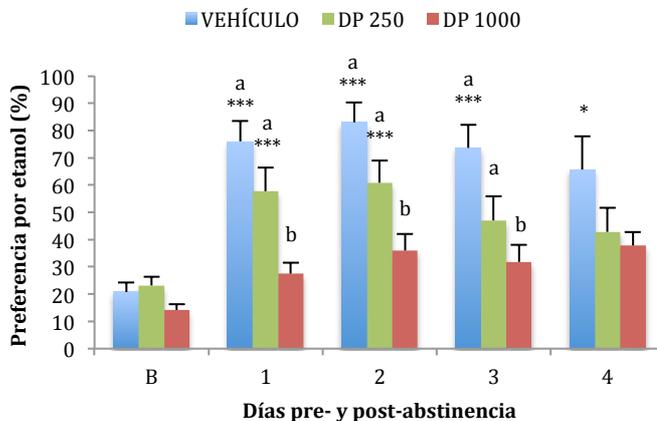


**Figura 5.13. Consumo de etanol (g/kg/día)** de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la administración continua por vía subcutánea de vehículo ( $n=8$ ), DP 250 µg/h ( $n=9$ ) o DP 1000 µg/h ( $n=8$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a sus correspondientes consumos basales ( $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ). Las diferentes *letras* (a,b) indican diferencias significativas en el consumo de alcohol entre los diferentes grupos ensayados para cada tiempo experimental ( $p<0.05$ ). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de consumo basal de etanol medidos en los tres grupos del experimento.

En los animales en los que se administró el vehículo, se observa un incremento estadísticamente significativo en el consumo de alcohol durante los cuatro días post-abstinencia con respecto a su consumo basal, lo cual es indicativo de la manifestación del fenómeno ADE. Los animales tratados con DP 250 µg/h mostraron un incremento significativo en el consumo de etanol indicando, de nuevo, la aparición del fenómeno ADE. Por el contrario, en los animales tratados con la dosis más alta de DP (1000 µg/h) no se produjo una variación significativa en el consumo de etanol, con respecto a su consumo basal, lo cual es claramente indicativo de la supresión del ADE. Como se puede observar, este efecto se prolongó hasta el cuarto día post-abstinencia. **Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de este aminoácido azufrado para prevenir de un modo dosis-dependiente la manifestación del fenómeno ADE en el modelo experimental empleado.**

## Resultados

Por último, también se ha analizado la influencia de la DP en la preferencia por el etanol en los animales sujetos al *modelo ADE*. En la Figura 5.14 se representan los valores promedio de *preferencia por el etanol* en los días previos y posteriores al quinto periodo de abstinencia.



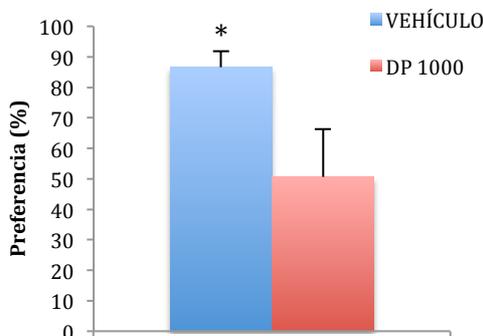
**Figura 5.14. Preferencia por etanol** (expresada en porcentaje) de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la administración de vehículo (n=8), DP 250  $\mu\text{g/h}$  (n=9) o DP 1000  $\mu\text{g/h}$  (n=8). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e.; "B" representa la preferencia basal por el etanol y se corresponde con la preferencia media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican los valores de ingesta que difieren significativamente con respecto a sus correspondientes preferencias basales (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Las diferentes *letras* (a,b) indican diferencias significativas en la preferencia por el alcohol entre los diferentes grupos ensayados para cada tiempo experimental ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de preferencia basal por etanol.

El análisis estadístico (ANOVA mixto) mostró la existencia de diferencias significativas a lo largo del tiempo (factor *tiempo*  $F(4,88)=28.794$ ;  $p<10^{-4}$ ), en el efecto *tratamiento* ( $F(2,22)=7.316$ ;  $p=0.004$ ) y en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,88)=3.741$ ;  $p<0.02$ ). El análisis de comparación múltiple confirmó que, en el grupo vehículo la preferencia por el etanol aumentó significativamente durante los cuatro días post-abstinencia con respecto a su preferencia basal. Los animales tratados con DP 250  $\mu\text{g/h}$  mostraron un incremento significativo en la preferencia por el alcohol durante los dos primeros días post-abstinencia ( $p<10^{-4}$ ). Sin embargo, los animales tratados con DP 1000  $\mu\text{g/h}$  no mostraron ningún cambio significativo en la preferencia por el alcohol a lo largo de todo el periodo post-abstinencia con respecto a su valor basal ( $p=0.877$ ,  $p=0.154$ ,  $p=0.973$  y  $p=0.505$  para los días post-abstinencia 1, 2, 3 y 4, respectivamente).

## Resultados

### 5.3 Experimento 2: Influencia de la DP (1000 µg/h) sobre la preferencia por una solución azucarada.

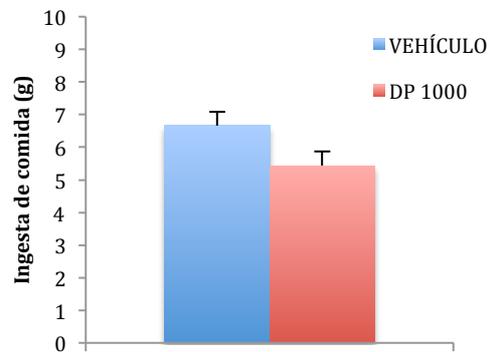
En la Figura 5.15, se representan los valores promedio de preferencia por la solución de sacarosa durante los 4 ensayos realizados (un ensayo cada 24 horas).



**Figura 5.15. Preferencia por una solución de sacarosa al 2%** (expresada en porcentaje) en los animales del grupo vehículo y DP 1000. Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e (media de los 4 ensayos realizados). Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ).

Como se puede observar, los animales del grupo vehículo mostraron una preferencia por la solución azucarada del  $86.38 \pm 5.30$  %, mientras que en los del grupo DP 1000 fue de  $50.64 \pm 15.60$  %. El análisis estadístico detectó la existencia de diferencias significativas (t de Student) ( $p = 0.001$ ). Por tanto, los resultados obtenidos muestran que **la administración sistémica de DP 1000 µg/h da lugar a una reducción significativa en la preferencia por la solución azucarada ofrecida.**

En este mismo experimento, también se ha cuantificado la ingesta de comida durante los cuatro días que duró el experimento. En la siguiente figura se presentan los valores obtenidos.



**Figura 5.16.** Ingesta de **comida sólida** (expresada en g/h) en los animales del grupo vehículo y grupo DP 1000. Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e (media de los 4 ensayos realizados).

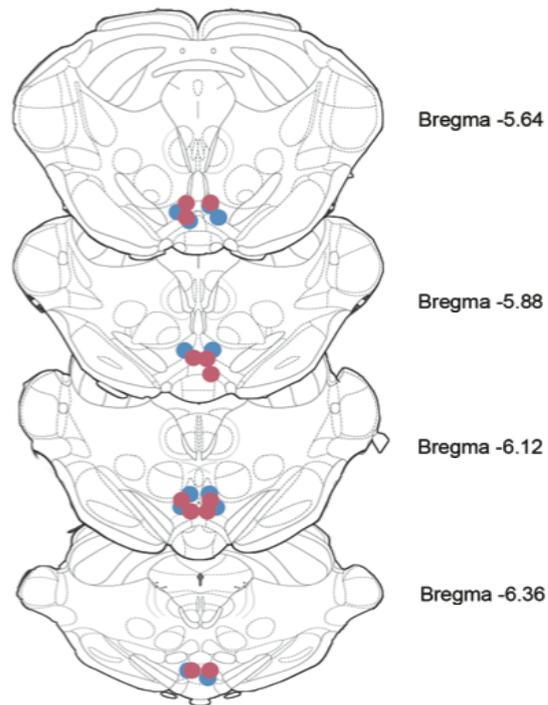
Tal y como se puede observar, la ingesta promedio de comida fue de alrededor de 6 g/hora en ambos grupos. El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre ambos valores ( $p=0.859$ ).

## Resultados

### 5.4 Experimento 3: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración intra-VTA-p.

#### Experimento 3A: Administración bilateral de la DP en VTA-p

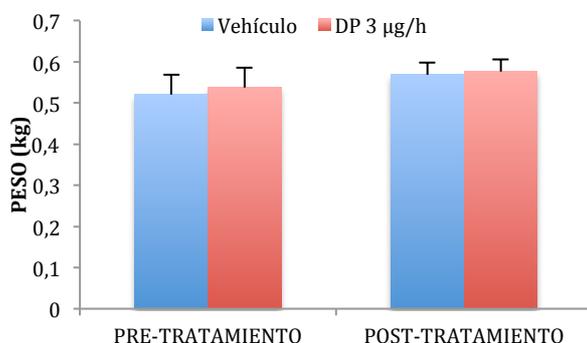
Tras el análisis histológico de los cerebros de los animales empleados en este experimento se procedió a excluir a dos animales (1 perteneciente al grupo vehículo y otro al grupo tratado con DP) de los catorce animales inicialmente incluidos. Por tanto, en este experimento finalmente se incluyeron **6 ratas en el grupo vehículo** y **6 ratas en el grupo DP**. La posición del extremo distal de las cánulas en los animales finalmente incluidos en el experimento se muestra esquemáticamente en la siguiente Figura 5.17:



**Figura 5.17. Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata** en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de las cánulas en las ratas empleadas en el **Experimento 3A**. Para facilitar la inspección de la figura, la posición de las cánulas en los animales pertenecientes al **grupo vehículo** se representan en color **azul**, mientras que las del **grupo DP 3** se representan en **rojo**. Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos G y col, 2007).

## Resultados

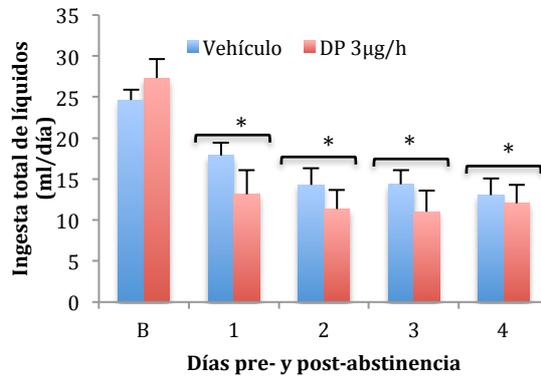
En la Figura 5.18 se representan los valores promedio, junto a su error estándar, del **peso de los animales** de cada grupo experimental determinados antes y después de recibir el tratamiento farmacológico.



**Figura 5.18. Peso corporal** (expresado en kg) determinado la semana previa y la semana posterior a la implantación quirúrgica de la bomba osmótica Alzet® en los animales empleados en el Experimento 3A.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la administración localizada de DP en el VTA no causó aparentemente variaciones significativas en el peso de los animales a lo largo del tiempo. El análisis estadístico confirmó esta observación, es decir, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los efectos analizados [*tratamiento* ( $F(1,8)=0.584$ ;  $p=0.467$ ), *tiempo* ( $F(1,8)=17.202$ ;  $p=0.300$ ) e interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(1,8)=2.338$ ;  $p=0.165$ )].

En la Figura 5.19 se representan los valores promedio de **ingesta total de líquidos** (expresada en ml) de los animales tratados con DP 3 $\mu$ g/h o con vehículo, tras el quinto periodo de abstinencia.

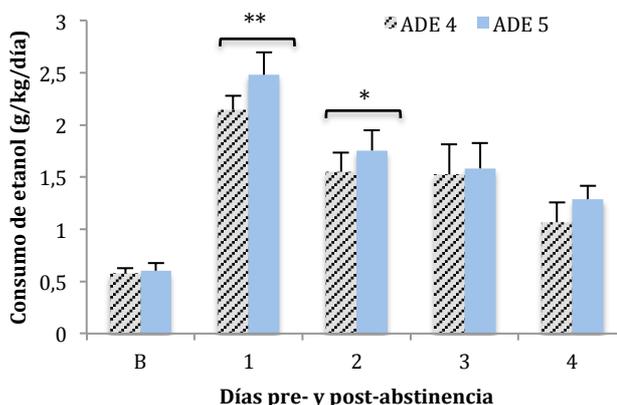


**Figura 5.19.** Ingesta total de líquidos (ml/día) de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la **administración bilateral continua en el VTA-p** de vehículo (n=6) o DP 3  $\mu$ g/h (n=6). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa la ingesta basal de líquidos y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a la ingesta basal de líquidos (\* $p$ <0.05). El test de comparación múltiple se ha realizado colapsando los dos grupos ensayados para cada tiempo experimental.

El análisis estadístico realizado no detectó diferencias estadísticamente significativas ni en el factor *tratamiento* ( $F(1,10)=0.567$ ;  $p=0.469$ ) ni en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(4,40)=2.027$ ;  $p=0.109$ ). Sin embargo el factor *tiempo* sí se muestra significativo ( $F(4,40)=32.623$ ;  $p<0.001$ ). El test de comparación múltiple, realizado colapsando los dos grupos ensayados para cada tiempo experimental, ha identificado la existencia de una reducción significativa en el volumen de líquidos consumido durante los cuatro días post-abstinencia con respecto al consumo basal.

## Resultados

Para descartar que la intervención quirúrgica pudiera afectar a la manifestación y a la magnitud del fenómeno ADE, se ha analizado, mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas, el consumo de etanol de los animales del grupo vehículo durante el ADE 4 (sin cirugía) y el ADE 5 (con cirugía) (Figura 5.20).



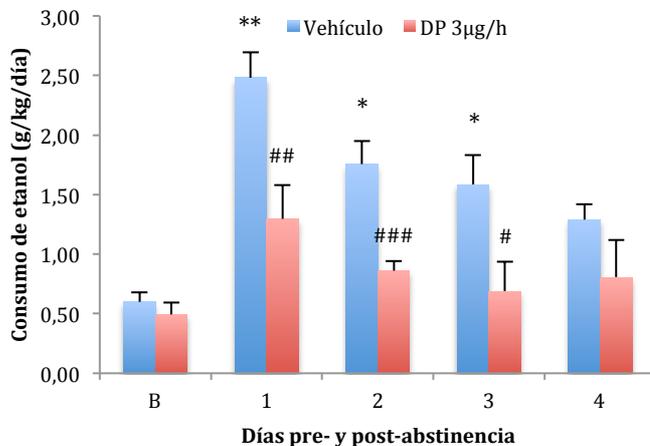
**Figura 5.20. Consumo de etanol (g/kg/día)** de los animales del grupo vehículo sujetos al *modelo ADE* durante el **cuarto** (barras rayadas) y el **quinto** (barras azules) **periodo de post-abstinencia** (n=6). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e.; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los **asteriscos** denotan diferencias significativas con respecto al consumo basal (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). El test de comparación múltiple se ha realizado colapsando los dos grupos ensayados a cada tiempo experimental.

Como se puede apreciar, el incremento en el consumo de etanol del grupo vehículo tras el quinto periodo de abstinencia (ADE 5) es similar al observado tras el periodo de abstinencia previo (ADE 4), en el cual los animales no habían sido sometido a ningún procedimiento quirúrgico. El análisis estadístico confirmó la ausencia de diferencias significativas tanto en el efecto *número de ADE* ( $F(1,5)=6.520$ ;  $p=0.051$ ) como en la interacción *tiempo x número de ADE* ( $F(4,20)=0.431$ ;  $p=0.785$ ). Sí detectó, como se esperaba, diferencias significativas en el consumo de alcohol a lo largo del *tiempo* ( $F(4,20)=38.752$ ;  $p < 10^{-4}$ ) confirmando que, tras ambos periodos de

abstinencia apareció el incremento temporal en el consumo de etanol característico del fenómeno ADE. Estos resultados muestran que tanto el perfil como la magnitud del fenómeno ADE en ambas fases de abstinencia son similares, **descartando así que los animales hipotéticamente beban menos alcohol por una falta de recuperación del procedimiento quirúrgico o que bebieran más para aliviar un posible dolor post-quirúrgico.**

## Resultados

Una vez validado nuestro sustrato experimental, se ha procedido a evaluar la eficacia antirecaída de la DP administrada localmente en el VTA-p. En la siguiente figura se representan los valores promedio del consumo de etanol (g/kg/día) de los animales pertenecientes a este experimento.



**Figura 5.21. Consumo de etanol (g/kg/día) de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la administración bilateral continua en el VTA-p de vehículo (n=6) o DP 3 µg/h (n=6).** Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican los valores de ingesta que difieren significativamente con respecto a los correspondientes consumos basales (\*p<0.05, \*\*p<0.01). Las *almohadillas* indican la existencia de diferencias significativas en los valores de consumo de etanol entre los dos grupos ensayados para cada día post-abstinencia (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de consumo basal de etanol medidos en los dos grupos ensayados.

Como se puede observar, los animales del grupo vehículo mostraron un incremento temporal y significativo en el consumo de etanol, con respecto a su consumo basal, tras la reintroducción de las soluciones de alcohol, indicativo del *fenómeno ADE*. Sin embargo, los animales que recibieron 3 µg/h de DP directamente en el VTA-p no manifestaron este fenómeno. El análisis estadístico confirmó la existencia de diferencias significativas en el consumo de etanol a lo largo del *tiempo* ( $F(4,40)=19.968$ ;  $p<10^{-4}$ ), entre los animales tratados con DP y con vehículo ( $F(1,10)=17.906$ ;  $p=0.002$ ) y en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(4,40)=3.592$ ;  $p=0.014$ ). El análisis de comparación múltiple confirmó que, el consumo de etanol en los animales

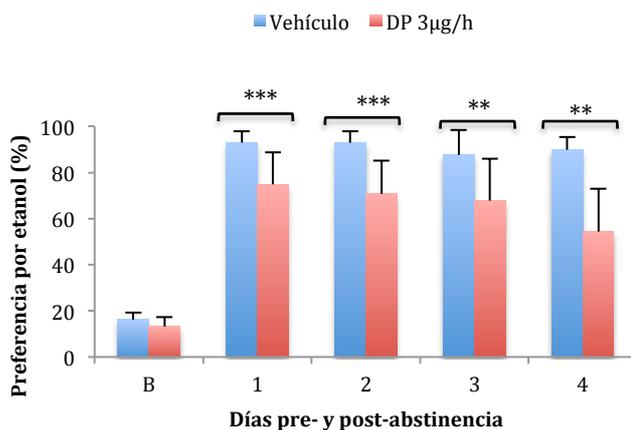
## *Resultados*

tratados con DP no mostró diferencias significativas con respecto a su consumo basal durante ninguno de los cuatro días post-abstinencia ( $p=0.055$ ,  $p=0.779$ ,  $p=1.000$  y  $p=1.000$ , respectivamente). El test de Bonferroni, también detectó una reducción significativa del consumo de alcohol al comparar el valor observado en los animales tratados con DP con el obtenido en el grupo tratado con vehículo durante los días post-abstinencia 1, 2 y 3 ( $p<0.05$ ).

## Resultados

Por último, en la Figura 5.22 se representan los valores promedio de **preferencia por el etanol** en los animales tratados con DP o con vehículo durante el quinto periodo de abstinencia.

El análisis estadístico no detectó diferencias significativas ni en el efecto *tratamiento* ( $F(1,10)=2.427$ ;  $p=0.150$ ) ni en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(4,40)=1.055$ ;  $p=0.391$ ). Sólo se detectaron diferencias significativas en el efecto *tiempo* ( $F(4,40)=26.519$ ;  $p<10^{-4}$ ).



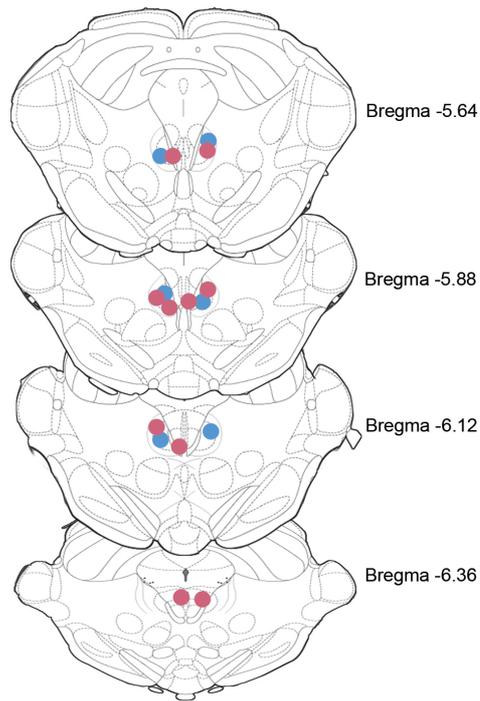
**Figura 5.22. Preferencia por el etanol** (expresada en porcentaje) tras la administración bilateral continua en el VTA-p de vehículo ( $n=6$ ) o DP 3 µg/h ( $n=6$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e.; "B" representa la preferencia basal de etanol y se corresponde con la preferencia media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a la preferencia basal (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ) en el análisis de comparación múltiple realizado tras colapsar los valores obtenidos en los dos grupos experimentales para cada tiempo experimental.

Como se puede observar, la preferencia por el etanol en los animales tratados con DP tendió a ser inferior que en los animales control, aunque tal y como se ha indicado anteriormente, no se detectaron diferencias significativas entre ellos.

*Experimento 3B: Administración de DP en una zona cerebral dorsal al VTA-p*

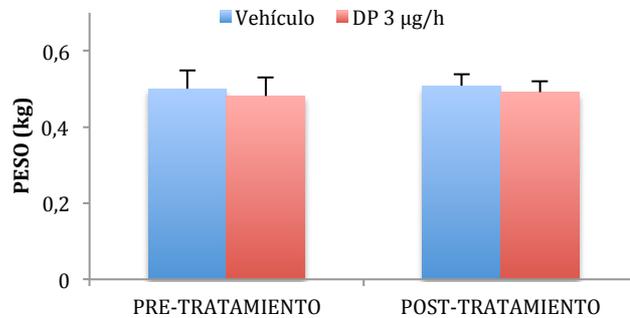
Tras el análisis histológico de los cerebros de los animales empleados en este experimento se procedió a excluir a dos animales (ambos pertenecientes al grupo tratado con vehículo) de los diez inicialmente incluidos, ya que el extremo distal de las cánulas se localizaron fuera de la región objetivo. Por tanto, el análisis de este experimento finalmente incluyó **3 ratas en el grupo vehículo y 5 ratas en el grupo DP**. La posición del extremo distal de las cánulas en los animales incluidos en el experimento se muestra esquemáticamente en la siguiente figura:

## Resultados



**Figura 5.23. Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata** en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de las cánulas en las ratas empleadas en el **Experimento 3B**. Para facilitar la inspección de la figura, la posición de las cánulas de los animales pertenecientes al **grupo vehículo** se representan en color **azul**, mientras que las del **grupo DP 3** se representan en **rojo**. Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos G y col, 2007).

En la Figura 5.24 se representan los valores promedio, junto a su error estándar, del **peso de los animales** de cada grupo experimental determinados antes y después de recibir el tratamiento farmacológico.

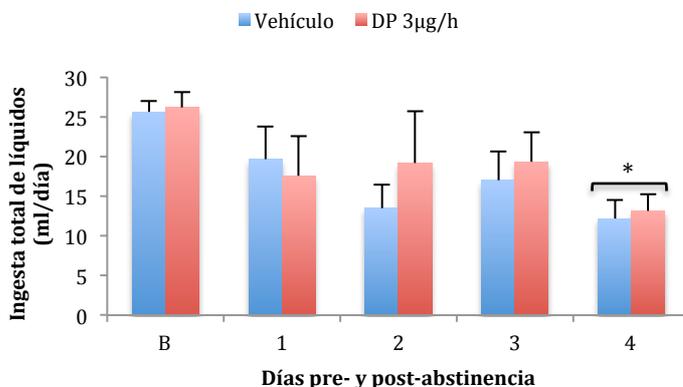


**Figura 5.24. Peso corporal** (expresado en kg) determinado la semana previa y la semana posterior a la implantación quirúrgica de la bomba osmótica Alzet® en los animales del Experimento 3B.

A tenor de los resultados obtenidos, la administración localizada de DP en una zona cerebral fuera del VTA no causó aparentemente variaciones significativas en el peso de los animales. El análisis estadístico confirmó esta observación, es decir, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los efectos analizados: *tratamiento* ( $F(1,6)=0.874$ ;  $p=0.411$ ), *tiempo* ( $F(1,6)=19.502$ ;  $p=0.392$ ) e interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(1,6)=2.568$ ;  $p=0.255$ ).

## Resultados

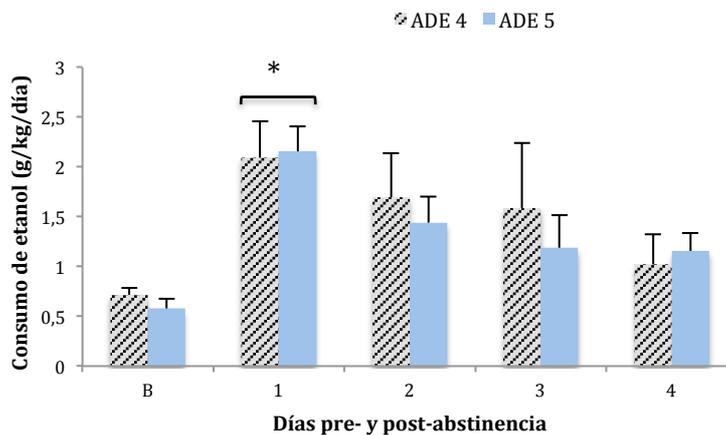
En la Figura 5.25 se representan los valores promedio de ingesta total de líquidos (expresada en ml) de los animales tratados con DP 3µg/h o con vehículo, tras el quinto periodo de abstinencia.



**Figura 5.25. Ingesta total de líquidos** (ml/día) de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la **administración bilateral continua en un área dorsal al VTA-p** de vehículo (n=3) o DP 3 µg/h (n=5). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa la ingesta basal de líquidos y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a la ingesta basal de líquidos (\*p<0.05) en el test de comparación múltiple realizado tras colapsar los dos grupos ensayados a cada tiempo experimental.

El análisis estadístico no ha detectado la existencia de diferencias significativas en el volumen total de líquidos consumidos entre los animales del grupo vehículo y los tratados con DP [factor *tratamiento*: (F(1,6)=0.102; p=0.761)], ni en la interacción *tiempo x tratamiento* (F(4,24)=0.419; p=0.793). El factor *tiempo* sí se muestra significativo (F(4,24)=4.863; p=0.005). Aunque sólo se ha identificado significación estadística entre el día post-abstinencia 4 y el consumo basal.

Con objeto de descartar que la intervención quirúrgica pudiera tener alguna influencia en la manifestación y/o en la magnitud del fenómeno ADE, se ha analizado, mediante un ANOVA de dos vías, el consumo de etanol de los animales del grupo tratado con vehículo durante el ADE 4 (sin cirugía) y el ADE 5 (con cirugía) (Figura 5.26).

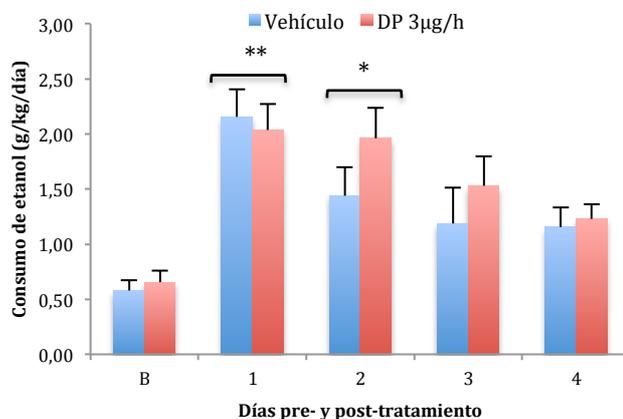


**Figura 5.26. Consumo de etanol (g/kg/día)** de los animales del grupo tratado con vehículo sujetos al *modelo ADE* durante el **cuarto** (barras azules) y el **quinto** (barras rayadas) **periodo de post-abstinencia** (n=3). Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a la preferencia basal ( $p < 0.05$ ) en la prueba de comparación múltiple realizada tras colapsar los dos grupos experimentales a cada tiempo experimental.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ni en el efecto *número de ADE* ( $F(1,8)=0.071$ ;  $p=0.815$ ) ni en la interacción *tiempo x número de ADE* ( $F(4,8)=0.213$ ;  $p=0.924$ ). Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas en el efecto *tiempo* ( $F(4,8)=14.628$ ;  $p < 10^{-4}$ ) confirmando que, tras el periodo de abstinencia apareció el incremento significativo y temporal en el consumo de etanol, característico del fenómeno ADE. Es decir, tanto el perfil como la magnitud del fenómeno ADE en ambas fases de abstinencia son similares, descartando así que los animales hipotéticamente bebieran menos alcohol por una falta de recuperación del procedimiento quirúrgico o que bebieran más para aliviar el dolor post-quirúrgico.

## Resultados

Tras la validación de nuestro sustrato experimental, se ha procedido a evaluar la eficacia antirecaída de la DP administrada deliberadamente en una zona dorsal al VTA-p. En la siguiente figura se representan los valores promedio del **consumo de etanol** (g/kg/día) de los animales tratados con DP o vehículo, tras el quinto periodo de abstinencia.

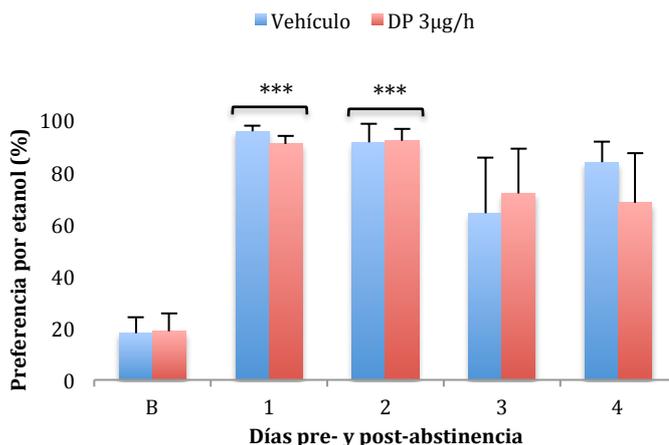


**Figura 5.27. Consumo de etanol** (g/kg/día) de los animales sujetos al *modelo ADE* tras la **administración bilateral** en una zona **dorsal al VTA-p** de vehículo (n=3) ó DP 3 µg/h (n=5). Los datos se presentan como media ± e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican los valores de ingesta que difieren significativamente con respecto a los correspondientes consumos basales (\*p<0.05, \*\*p<0.01) en la prueba de comparación múltiple realizada tras colapsar los grupos experimentales a cada tiempo experimental. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de consumo basal de etanol.

Sólo se detectaron diferencias significativas a lo largo del *tiempo* ( $F(4,24)=23.653$ ;  $p<10^{-4}$ ). No se detectaron diferencias significativas ni para el efecto *tratamiento* ( $F(1,6)=0.284$ ;  $p=0.613$ ), ni para la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(4,24)=1.372$ ;  $p=0.273$ ). El test de comparación múltiple, realizado tras colapsar los dos grupos ensayados a cada tiempo experimental, identificó un incremento significativo en el consumo de alcohol durante los días 1 y 2 post-abstinencia ( $p<0.05$ ) con respecto al consumo basal. El análisis de varianza de una vía, confirmó que tanto los animales del grupo vehículo ( $F(4,8)=8.702$ ;  $p=0.005$ ) como los del grupo DP ( $F(4,16)=12.300$ ;  $p<10^{-4}$ ) manifestaron el fenómeno ADE. Es decir, **la**

administración de DP en una zona dorsal al VTA-p fue incapaz de impedir la manifestación del fenómeno ADE, lo cual permite descartar la falta de selectividad en los efectos preventivos de la recaída de la DP, e identificar el VTA-p como una zona diana específica de los efectos antirecaída de este aminoácido.

En la Figura 5.28 se representan los valores promedio de **preferencia por etanol** en los animales tratados con DP o vehículo, tras el quinto periodo de abstinencia.



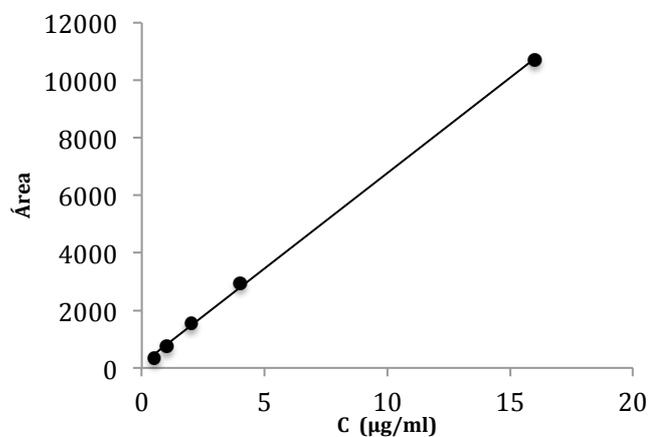
**Figura 5.28.** Preferencia por etanol (%) tras la **administración continua bilateral** en una zona **dorsal al VTA-p** de vehículo (n=3) o DP 3 µg/h (n=5). Los datos se presentan como media ± e.e.; “B” representa la preferencia basal de etanol y se corresponde con la preferencia media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a la preferencia basal (\*\*p<0.001) en la prueba de comparación múltiple realizada tras colapsar los valores obtenidos en los dos grupos experimentales a cada tiempo experimental.

El análisis estadístico detectó la existencia de diferencias significativas a lo largo del *tiempo* ( $F(4,24)=19.588$ ;  $p<10^{-4}$ ). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas ni en el *factor tratamiento* ( $F(1,6)=0.029$ ;  $p=0,869$ ), ni en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(4,24)=0.396$ ;  $p=0.810$ ).

## Resultados

### 5.5 Experimento 4: Niveles de DP en plasma y en tejido cerebral y eficacia antirecaída.

En la Figura 5.29 se representa, a modo de ejemplo, una de las rectas de calibración obtenida tras la valoración, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), de distintas soluciones patrón de **DP en plasma**.



**Figura 5.29.** Representación gráfica de las **áreas** (unidades arbitrarias) obtenidas en la lectura de los patrones preparados en **plasma**, frente a la **concentración de DP** (C), expresada en µg/ml. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad del método analítico. La ecuación de ajuste a estos puntos es la siguiente:

$$\text{Área} = 142.43 + 663.3 \cdot C \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intra-ensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en la Tabla 5.1.

$C_T$	$C_E$	d.e.	C.V (%)	n	% desviación
0.5	0,47	0,05	11,4	6	5,82
1	0,91	0,07	7,58	6	9,15
2	1,90	0,07	3,76	6	5,15
4	4,03	0,21	5,31	6	-0,85
16	15,2	0,47	3,11	6	4,91

**Tabla 5.1.** Ensayo de exactitud y precisión intra-ensayo del método de valoración de la DP en plasma mediante HPLC. En la primera columna se representa la concentración teórica de la DP presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo ( $C_T$ ), expresada en  $\mu\text{g/ml}$ . En la siguiente columna se indican los valores experimentales promedios de concentración de DP ( $C_E$ ), en  $\mu\text{g/ml}$ , calculados para un número de determinaciones igual a n, siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre la concentración teórica y la concentración experimental de DP en forma de porcentaje (% desviación).

## Resultados

En la Tabla 5.2. se resumen las concentraciones de DP cuantificadas en **plasma** y en **tejido cerebral** en dos momentos temporales diferentes (muestra **M1** y **M2**) tras la infusión subcutánea del fármaco a razón de **250** ó **1000 µg/h**.

		VELOCIDAD PERFUSIÓN DP	
		250 µg/h	1000 µg/h
<b>MUESTRA 1</b>	PLASMA (µg/ml)	0.4±0.01	2.8±0.47
	CEREBRO ANTERIOR (µg/g)	-	0.054±0.013 (1.73%) <sup>a</sup>
	CEREBRO MEDIO (µg/g)	-	0.071±0.017 (2.43%) <sup>a</sup>
<b>MUESTRA 2</b>	PLASMA (µg/ml)	0.6±0.14	4.3±0.37
	CEREBRO ANTERIOR (µg/g)	-	0.091±0.015 (1.95%) <sup>a</sup>
	CEREBRO MEDIO (µg/g)	-	0.16±0.029 (3.7%) <sup>a</sup>

**Tabla 5.2. Concentraciones plasmáticas y en tejido cerebral de DP** obtenidas el día 2 (**Muestra 1**) y el día 7 (**Muestra 2**) tras la implantación quirúrgica de la bomba osmótica en los animales del Experimento 4. Los datos se presentan como media ± e.e. (-) indica que los niveles de DP no pudieron ser detectados. (<sup>a</sup>) indica la fracción de DP medida en las muestras cerebrales respecto a la alcanzada en el plasma en el mismo tiempo, expresada como porcentaje.

La **concentración plasmática de DP** osciló aproximadamente entre 0.4 y 0.5 µg/ml en las muestras M1 y M2 tras la perfusión de 250 µg/h de DP. Lógicamente, los niveles plasmáticos determinados tras la infusión de 1000 µg/h de DP fueron significativamente superiores, oscilando alrededor de 2.8 y 4.3 µg/ml para las muestras determinadas en el mismo momento del ensayo. Como se puede observar, en ambas dosis, la concentración plasmática determinada en las muestra M2 tendió a ser mayor que la cuantificada

anteriormente, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre ellas ni para la dosis de 1000 µg/h ( $p=0.055$ ) ni para la dosis de 250 µg/h ( $p=0.403$ ).

Adicionalmente, también se determinaron los niveles de DP en dos regiones cerebrales claramente diferenciadas (cerebro anterior y cerebro medio). Tras la perfusión de 1000 µg/h de DP, los niveles de fármaco alcanzados en ambas regiones oscilaron entre un 2-3 % de sus correspondientes niveles plasmáticos. Por otro lado, fue imposible cuantificar los niveles de DP en el tejido cerebral cuando ésta se perfundió a 250 µg/h ya que se tratará probablemente de niveles muy bajos, por debajo del límite de detección del método analítico empleado.

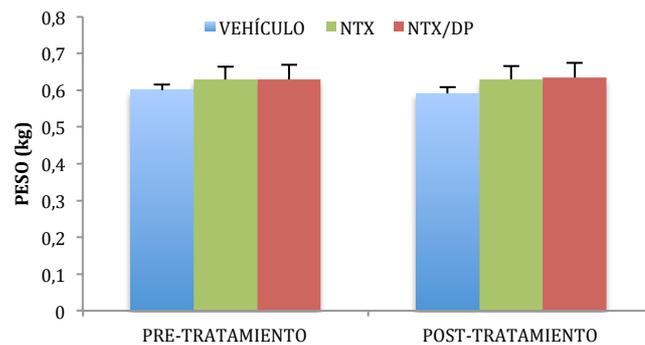
Curiosamente, los datos obtenidos indican que en ambos tiempos de muestreo, M1 y M2, los niveles de DP determinados en cerebro medio siempre tendieron a ser superiores a los encontrados en cerebro anterior, aunque **no** se detectaron diferencias significativas entre las dos zonas (**M1**  $p=0.564$  / **M2**  $p=0.123$ ). Al igual que con las muestras plasmáticas, los niveles de DP en tejido cerebral en M2 tendieron a ser superiores que los de M1 en ambas regiones cerebrales, sin embargo tampoco se detectaron diferencias significativas a lo largo del tiempo.

En resumen, estos resultados demuestran que tanto en el momento de la reintroducción de las soluciones de etanol (M1) como al final del periodo post-abstinencia (M2) existen niveles de DP en el plasma y en el cerebro del animal. Además, estos niveles se mantienen constantes a lo largo de todo el ensayo. Considerando conjuntamente los resultados de este experimento con los de la eficacia farmacológica obtenidos en el Experimento 1, se puede afirmar que al menos se necesita una concentración plasmática de DP de alrededor de 2.8-2.9 µg/ml (concentración alcanzada en plasma el día 2 tras la implantación de la bomba que lleva 1000 µg/h de DP) para obtener eficacia en la prevención de las recaídas.

## Resultados

### 5.6 Experimento 5: Evaluación de la eficacia antirecaída de una terapia combinada de DP y naltrexona.

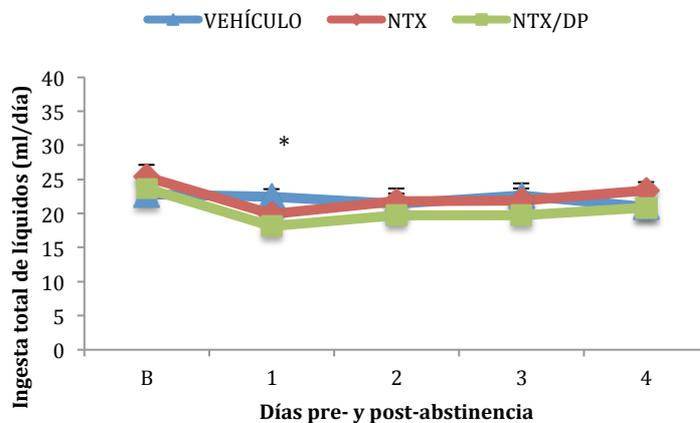
En la Figura 5.30 se representan los valores promedio, junto a su error estándar, del **peso de los animales** de los grupos **vehículo**, **NTX** y **NTX/DP** determinados antes y después de recibir el correspondiente tratamiento.



**Figura 5.30. Peso corporal** (kg) en los animales empleados en el Experimento 5 determinados antes y después de recibir el tratamiento farmacológico ensayado.

El análisis estadístico no detectó variaciones significativas en el peso de los animales a lo largo del *tiempo* ( $F(4,80)=0.319$ ;  $p=0.864$ ). Tampoco se detectaron diferencias significativas ni entre los diferentes *tratamientos* ( $F(2,20)=0.573$ ;  $p=0.573$ ), ni en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,80)=0.450$ ;  $p=0.887$ ).

En la Figura 5.31 se representan los valores de ingesta total de líquidos consumidos por los animales tratados con vehículo, NTX ó NTX/DP, tras el quinto periodo de abstinencia.

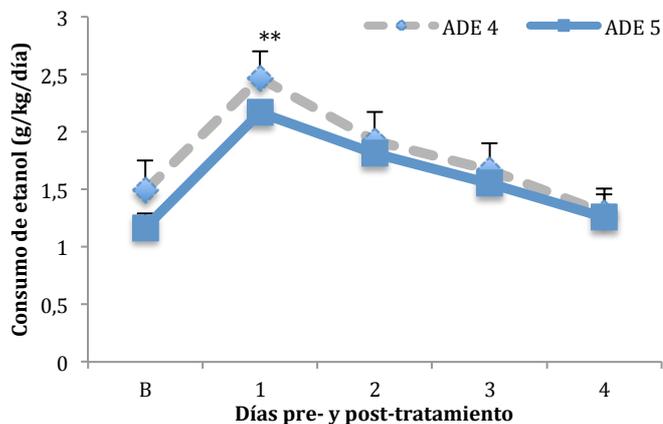


**Figura 5.31. Ingesta total de líquidos** (ml/día) tras la administración del vehículo (n=7), la inyección subcutánea rápida de naltrexona 5 mg/kg cada 12 horas (n=7), o la inyección subcutánea rápida de naltrexona 5 mg/kg cada 12 horas junto a una perfusión subcutánea de 250 µg/h de DP (n=7). Los datos se presentan como media ± e.e; "B" representa la ingesta basal de líquidos y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la ingesta basal de líquidos (\*p<0.05) en el test de comparación múltiple realizado tras colapsar los tres grupos ensayados a cada tiempo experimental.

El análisis estadístico no detectó diferencias significativas en la ingesta líquida total ni debido al *tratamiento* ( $F(2,18)=0,428$ ;  $p=0,658$ ) ni en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,72)=1,535$ ;  $p=0,160$ ). Sólo se detectó un efecto significativo del *tiempo* ( $F(4,72)=6,129$ ;  $p<10^{-4}$ ). El ANOVA de una vía de medidas repetidas aplicado al **grupo vehículo** ha permitido descartar que la intervención quirúrgica pudiera tener alguna influencia sobre el consumo total de líquidos ( $F(4,28)=1.819$ ;  $p=0.153$ ).

## Resultados

Para confirmar que el efecto de la cirugía no afecta a la magnitud del fenómeno ADE, se analizó, mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas, el consumo de etanol de los animales del grupo vehículo durante el ADE 4 (sin cirugía) y el ADE 5 (con cirugía) (Figura 5.32).



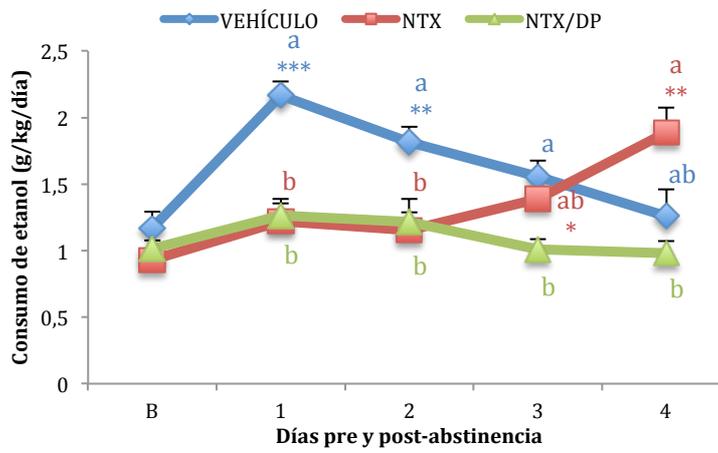
**Figura 5.32. Consumo de etanol** en los animales pertenecientes al **grupo vehículo** durante el **cuarto (ADE 4)** y el **quinto (ADE 5) período de post-abstinencia**. Los datos se presentan como media  $\pm$  e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. No se detectaron diferencias significativas en el consumo de etanol entre el cuarto y el quinto período de abstinencia. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al consumo basal (\*\* $p < 0.01$ ) en la prueba de comparación múltiple realizada tras colapsar los valores de ADE 4 y ADE 5 a cada tiempo experimental.

No se detectaron diferencias significativas entre los dos ADEs comparados ( $F(1,24)=0.394$ ;  $p=0,554$ ) ni en la interacción *tiempo x número de ADE* ( $F(4,24)=0.034$ ;  $p=0.943$ ). El análisis estadístico sólo detectó diferencias significativas en el efecto tiempo ( $F(1,24)=11.995$ ;  $p < 10^{-4}$ ), confirmando que tras ambos periodos de abstinencia apareció el incremento temporal en el consumo de etanol característico de la manifestación del fenómeno ADE. Estos datos, al igual que en los experimentos anteriores, sugieren que **tanto el perfil como la magnitud del fenómeno ADE son similares en los dos periodos**, permitiendo **descartar que las manipulaciones realizadas** (la implantación de la bomba osmótica y el

régimen de inyecciones subcutáneas) **tengan alguna influencia en el comportamiento de ingesta habitual del animal.**

Una vez validado el sustrato experimental empleado, se ha procedido a evaluar la eficacia de la combinación NTX/DP en la prevención de la recaída en el consumo de etanol.

En la Figura 5.33 se representa el **consumo de etanol** de los animales tratados con vehículo, NTX o bien una combinación de NTX/ DP, tras el quinto periodo de abstinencia.



**Figura 5.33. Consumo de etanol (g/kg/día)** tras la administración del vehículo (n=7), la inyección subcutánea de NTX 5 mg/kg cada 12 horas (n=7), o la inyección subcutánea de NTX 5 mg/kg cada 12 horas junto con una perfusión subcutánea de 250 µg/h de DP (n=7). Los datos se presentan como media ± e.e; "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto al consumo basal de alcohol (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). Las diferentes *letras* (a,b) indican diferencias significativas entre los diferentes grupos ensayados para cada tiempo experimental (p<0.05). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de consumo basal de etanol.

## Resultados

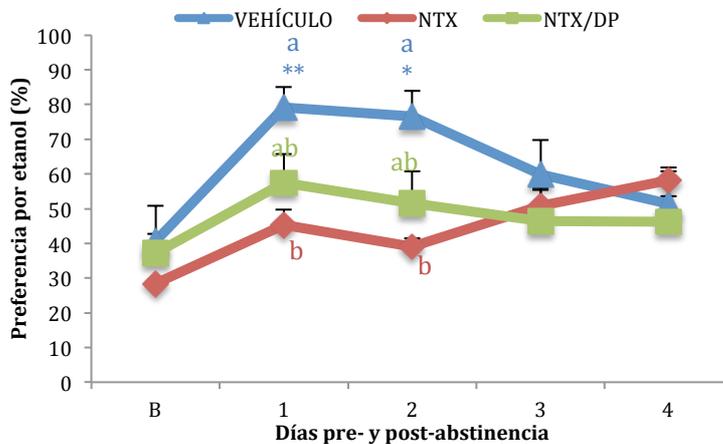
El ANOVA mixto ha detectado diferencias significativas en el efecto *tiempo* ( $F(4,72)=7,787$ ;  $p<10^{-4}$ ), en el efecto *tratamiento* ( $F(2,18)=6,269$ ;  $p=0,009$ ) y en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,72)=7,579$ ;  $p<10^{-4}$ ).

El análisis de comparación múltiple posterior permitió determinar que, en comparación con su consumo basal:

- Los animales del grupo vehículo muestran un incremento significativo del consumo de alcohol durante los días post-abstinencia 1 ( $p<0.0001$ ) y 2 ( $p=0.002$ ), lo cual demuestra la aparición del fenómeno ADE en este grupo.
- La administración SC de NTX (5 mg/kg cada 12 horas) impide el incremento en el consumo de alcohol sólo durante los días post-abstinencia 1 y 2. Sin embargo, estos animales manifestaron un incremento significativo en el consumo de alcohol respecto al valor basal los días post-abstinencia 3 ( $p=0.044$ ) y post-abstinencia 4 ( $p=0.002$ ).
- Sólo los animales que recibieron la terapia combinada con NTX/DP no han manifestado ninguna variación en el consumo de alcohol respecto a los correspondientes valores basales durante los cuatro días post-abstinencia.

Adicionalmente, el test de Bonferroni también ha revelado la existencia de diferencias significativas en el consumo de alcohol durante el cuarto día post-abstinencia entre las ratas tratadas con la combinación de NTX/DP y las que recibieron sólo NTX ( $p=0.011$ ). En conjunto, **estos resultados demuestran que la administración combinada de DP y NTX es capaz de prevenir los incrementos de ingesta a lo largo de los cuatro días post-abstinencia analizados, efecto que no se pudo lograr administrando únicamente NTX.**

Por último, en la Figura 5.34 se representa la preferencia promedio por el etanol mostrada por los animales tratados con vehículo, NTX ó NTX/DP, tras el quinto periodo de abstinencia.



**Figura 5.34. Preferencia por etanol** (expresada en porcentaje) tras la administración de vehículo (n=7), la inyección subcutánea de NTX 5 mg/kg cada 12 horas (n=7), o la inyección subcutánea de NTX 5 mg/kg cada 12 horas junto con una perfusión subcutánea de 250 µg/h de DP (n=7). Los datos se presentan como media ± e.e; "B" representa la preferencia basal por el etanol y se corresponde con la preferencia media en los 3 días pre-abstinencia. Los *asteriscos* indican diferencias significativas con respecto a la preferencia basal por el alcohol (\*p<0.05; \*\*p<0.01). Las diferentes *letras* (a,b) indican diferencias significativas entre los diferentes grupos ensayados para cada tiempo experimental (p<0.05). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de consumo basal de etanol.

El ANOVA mixto muestra un efecto significativo tanto en el factor *tiempo* ( $F(4,72)=9.217$ ;  $p<10^{-4}$ ), como en la interacción *tiempo x tratamiento* ( $F(8,72)=3.135$ ;  $p=0.04$ ). Los resultados obtenidos, demuestran que tras la reintroducción de las soluciones de etanol, la preferencia por el etanol pasó desde aproximadamente un 35% hasta casi el 80% ( $p=0.004$ ) en los animales del grupo vehículo. Sin embargo, tanto los animales del grupo NTX como los del grupo NTX/DP no manifestaron cambios significativos, con respecto a su preferencia basal, durante todo el período post-abstinencia. Adicionalmente, cabe destacar que aunque no se detectaron diferencias significativas, la preferencia observada en los animales del grupo **NTX** mostró una tendencia al aumento en los días post-abstinencia 3 y 4.

## Resultados

### 5.7 Experimento 6: Determinación de los parámetros farmacocinéticos básicos de la DP en diferentes poblaciones de rata.

- Estudio A: Estudio de la linealidad farmacocinética de la DP en la rata adolescente sin experiencia previa en el consumo de alcohol.

a) Niveles plasmáticos:

Los niveles plasmáticos de DP obtenidos a los correspondientes tiempos de muestreo en los animales de los grupos A-2, A-10 y A-30 se agrupan en las Tablas 5.3 a 5.5. Junto con los valores individuales, se relacionan los valores promedio acompañados de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/kg)	RATA								
	Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	Media ± d.e.
2	2	4.4	3.4	4.8	6.6	6.4	4.2	5.7	5.0 ± 1.2
2	5	2.4	2.2	2.9	2.8	3.9	2.2	2.8	2.8 ± 0.6
2	10	1.0	1.0	1.3	1.5	1.4	1.1	1.4	1.2 ± 0.2
2	15	0.7	0.7	0.9	0.9	1.0	0.7	0.9	0.8 ± 0.1
2	20	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	0.6	0.6	0.6 ± 0.1
2	40	0.2	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3 ± 0.06
2	60	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2 ± 0.03

**Tabla 5.3.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **2 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo A-2 (ratas adolescentes)** sin experiencia previa en el consumo de alcohol). Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en µg/ml.

Dosis (mg/Kg)	RATA								Media $\pm$ d.e.
	Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	
10	2	62.1	53.9	57.7	50.0	57.9	25.8	20.6	46.9 $\pm$ 16.6
10	5	29.6	19.4	24.3	17.3	15.0	12.5	16.5	19.3 $\pm$ 5.9
10	10	15.9	10.5	15.2	8.0	9.5	8.0	7.6	10.7 $\pm$ 3.5
10	15	11.0	6.7	8.8	6.4	6.7	6.3	7.3	7.6 $\pm$ 1.7
10	20	9.1	4.8	7.1	4.3	5.5	4.6	5.4	5.8 $\pm$ 1.7
10	40	3.8	3.0	4.4	2.2	2.0	2.3	2.4	2.9 $\pm$ 0.9
10	60	2.0	1.4	1.7	1.1	0.8	1.4	1.3	1.4 $\pm$ 0.3
10	120	0.7	0.4	0.5	0.7	0.4	0.5	0.5	0.5 $\pm$ 0.1

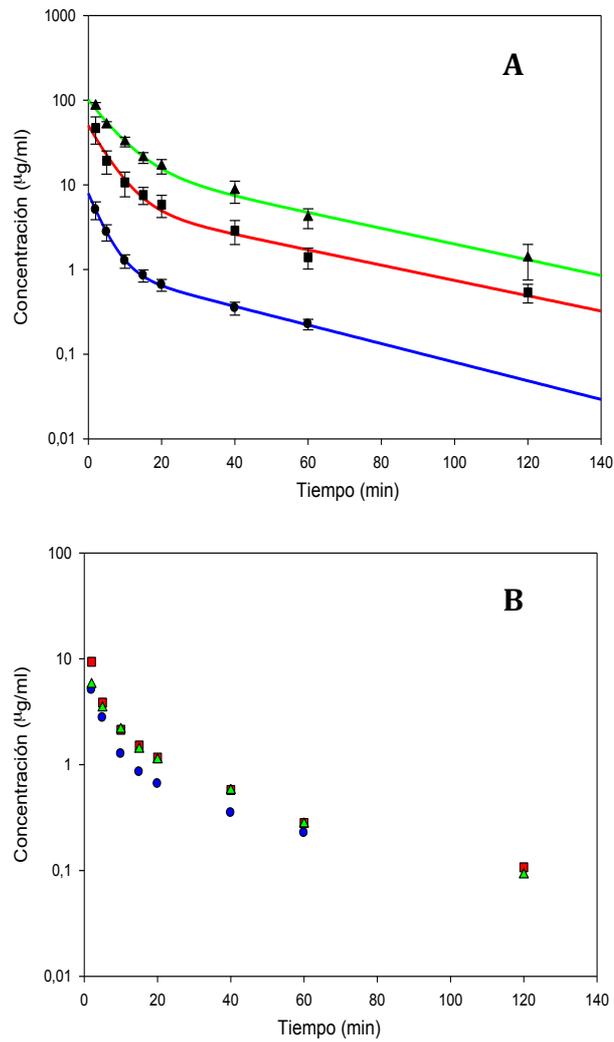
**Tabla 5.4.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **10 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo A-10 (ratas adolescentes)** sin experiencia previa en el consumo de alcohol). Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en  $\mu\text{g/ml}$ .

Dosis (mg/Kg)	RATA								Media $\pm$ d.e.
	Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	
30	2	79.2	80.1	82.7	89.0	100.2	85.0	86.1 $\pm$ 7.7	
30	5	45.0	47.9	53.5	52.5	55.6	54.5	51.5 $\pm$ 4.1	
30	10	27.6	26.4	35.9	34.2	35.8	34.0	32.3 $\pm$ 4.2	
30	15	15.3	20.5	20.8	22.7	23.7	22.6	20.9 $\pm$ 3.0	
30	20	12.8	14.7	14.5	21.6	17.0	18.7	16.6 $\pm$ 3.2	
30	40	5.7	5.8	8.4	10.3	9.1	12.0	8.5 $\pm$ 2.5	
30	60	2.7	2.8	4.3	5.1	4.7	5.0	4.1 $\pm$ 1.0	
30	120	0.9	0.7	1.3	0.9	2.0	2.1	1.3 $\pm$ 1.6	

**Tabla 5.5.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **30 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo A-30 (ratas adolescentes)** sin experiencia previa en el consumo de alcohol). Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en  $\mu\text{g/ml}$ .

## *Resultados*

En la Figura 5.35 (A) se representan las curvas de nivel plasmático promedio correspondientes a las dosis de 2, 10 y 30 mg/kg de DP obtenidos en **ratas adolescentes sin experiencia previa en el consumo de alcohol**. En el apartado (B) se representan los niveles plasmáticos promedio obtenidos en estos tres grupos experimentales, con la salvedad de que los valores correspondientes a los **grupos A-10 y A-30** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. Como se puede observar, los niveles plasmáticos normalizados NO se superponen, hecho que sugiere la existencia de un comportamiento **no lineal** en la farmacocinética de la DP en el ámbito de dosis ensayadas.



**Figura 5.35. A)** Curvas de nivel plasmático promedio obtenidas para los **grupos A-2, A-10 y A-30** tras la administración de una dosis de **2 (trazo azul), 10 (trazo rojo) y 30 (trazo verde) mg/kg de DP** respectivamente. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del ajuste, mediante regresión no lineal, de una ecuación biexponencial a los datos plasmáticos promedio. **(B)** Representación gráfica de los niveles plasmáticos promedio obtenidos para los **grupos A-2 (azul), A-10 (rojo) y A-30 (verde)**, donde los valores correspondientes a los **grupos A-10 y A-30** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas.

## Resultados

### b) Parámetros farmacocinéticos:

En las tablas 5.6 a 5.8 se muestran los parámetros farmacocinéticos individuales y promedios obtenidos para la DP en los grupos experimentales A-2, A-10 y A-30. Cada valor promedio va acompañado de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/kg)	Parámetro	RATA							Media ± d.e.
		1	2	3	4	5	6	7	
2	$A_0$ μg/ml	5.81	4.39	6.43	9.23	9.17	5.62	7.68	6.90 ± 1.85
2	$\alpha$ min <sup>-1</sup>	0.24	0.26	0.26	0.30	0.25	0.25	0.26	0.26 ± 0.01
2	$B_0$ μg/ml	0.72	0.95	1.22	1.21	1.15	0.76	1.04	1.01 ± 0.20
2	$\beta$ min <sup>-1</sup>	0.028	0.027	0.027	0.025	0.028	0.019	0.025	0.025 ± 0.002
2	$t_{1/2}$ (min)	28.88	24.58	25.58	25.39	27.51	35.55	27.51	27.85 ± 3.71
2	$CL_T$ (ml/min)	11.48	13.03	10.75	9.57	8.85	13.27	8.93	10.84 ± 1.83
2	$AUC_0^\infty$ (μg.min/ml)	54.33	50.64	69.38	75.47	81.61	61.33	70.32	66.91 ± 11.23

**Tabla 5.6.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.3, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **2 mg/kg** del fármaco en animales **adolescentes sin experiencia previa en el consumo de alcohol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

## Resultados

Dosis (mg/kg)	Parámetro	RATA							Media ± d.e.
		1	2	3	4	5	6	7	
10	$A_0$ μg/ml	60.01	77.46	62.00	43.58	175.8	21.86	19.56	65.76 ± 46.73
10	$\alpha$ min <sup>-1</sup>	0.17	0.33	0.22	0.19	0.66	0.15	0.13	0.26 ± 0.16
10	$B_0$ μg/ml	7.91	8.18	9.58	3.30	10.89	4.29	4.86	7.00 ± 3.15
10	$\beta$ min <sup>-1</sup>	0.020	0.026	0.025	0.015	0.039	0.017	0.020	0.023 ± 0.007
10	$t_{1/2}$ (min)	34.48	26.26	27.29	47.80	17.73	40.07	35.19	32.68 ± 9.89
10	$CL_T$ (ml/min)	4.85	5.55	5.84	7.40	6.00	7.53	7.00	6.31 ± 1.01
10	$AUC_0^\infty$ (μg.min/ml)	752.11	547.81	654.54	460.33	546.25	398.47	399.65	537.02 ± 151.80
10	$AUC_0^\infty(N)$ (μg.min/ml)	145.9	127.6	121.3	95.8	117.9	94.0	101.0	114.8 ± 21.4

**Tabla 5.7.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.4, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **10 mg/kg** del fármaco en animales **adolescentes sin experiencia previa en el consumo de alcohol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

## Resultados

Dosis (mg/kg)	Parámetro	RATA						Media ± d.e.
		1	2	3	4	5	6	
30	$A_0$ μg/ml	82.28	74.71	88.42	90.37	95.50	81.92	85.53 ± 7.37
30	$\alpha$ min <sup>-1</sup>	0.15	0.13	0.15	0.25	0.14	0.14	0.16 ± 0.04
30	$B_0$ μg/ml	11.17	12.85	16.84	34.40	14.56	17.85	17.94 ± 8.43
30	$\beta$ min <sup>-1</sup>	0.021	0.023	0.021	0.030	0.017	0.018	0.022 ± 0.004
30	$t_{1/2}$ (min)	32.39	29.25	32.70	22.95	41.76	38.30	32.89 ± 6.63
30	$CL_T$ (ml/min)	9.54	10.34	9.30	7.82	5.69	7.90	8.43 ± 1.66
30	$AUC_0^\infty$ (μg.min/ml)	1068.84	1113.26	1373.95	1495.98	1580.10	1572.21	1367.39 ± 226.80
30	$AUC_0^\infty(N)$ (μg.min/ml)	74.2	68.4	76.1	90.5	124.3	89.6	86.5 ± 19.3

**Tabla 5.8.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.5, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **30 mg/kg** del fármaco en animales **adolescentes sin experiencia previa en el consumo de alcohol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

## c) Análisis estadístico de los resultados:

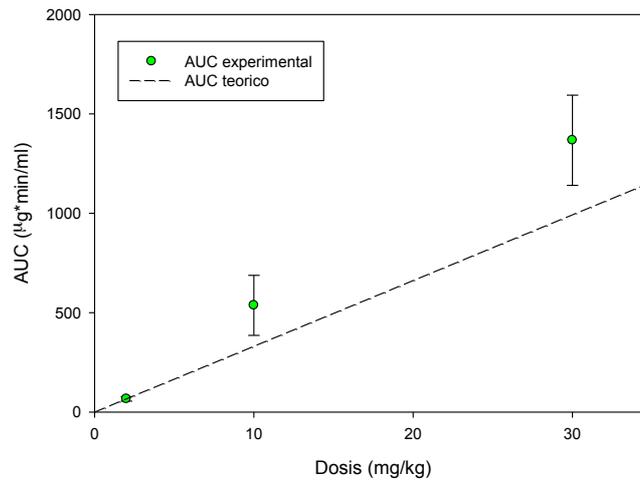
La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos de la DP calculados para los distintos grupos experimentales se resume en la Tabla 5.8.

DOSIS (mg/Kg)	Cl <sub>T</sub> (ml/min)	t <sub>1/2</sub> (min)	AUC <sub>0</sub> <sup>∞(N)</sup> (μg. min/ml)
2	10.84±1.8 <sup>a</sup>	27.8±3.7	66.9±11.2 <sup>a</sup>
10	6.31±1.0 <sup>b</sup>	32.7±9.8	114.8±21.4 <sup>b</sup>
30	8.43±1.7 <sup>b</sup>	32.9±6.6	86.5±19.3 <sup>c</sup>
Significación	p<10 <sup>-4</sup>	n.s.	p<10 <sup>-4</sup>

**Tabla 5.9.** Resultados del ANOVA realizado sobre los principales parámetros farmacocinéticos de la DP en la rata adolescente sin experiencia previa en el consumo de alcohol. Los valores de AUC<sub>0</sub><sup>∞(N)</sup> correspondientes a los grupos A-10 y A-30 han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. Aquellos valores con distintos superíndices presentan diferencias significativas entre ellos (p<0.05).

Los resultados obtenidos demuestran que la **disposición de la DP** en la **rata adolescente sin experiencia previa en el consumo de alcohol** es claramente **no lineal**. Los valores de AUC<sub>0</sub><sup>∞</sup> no aumentan de forma lineal a medida que aumenta la dosis administrada, es decir se han detectado diferencias estadísticamente significativas en los valores normalizados (AUC<sub>0</sub><sup>∞(N)</sup>) en función de la dosis administrada (p<10<sup>-4</sup>). Además, en la Figura 5.36 se representan gráficamente los valores de AUC obtenidos experimentalmente en función de la dosis administrada. En esta gráfica, se incluye la línea correspondiente a los valores de AUC que hipotéticamente se obtendrían si no existieran pérdidas de linealidad (AUC teórico).

## Resultados



**Figura 5.36.** Representación gráfica de los valores de  $AUC_{0}^{\infty}$  obtenidos de forma experimental correspondientes a los grupos A-2, A-10 y A-30 (puntos verdes). Los datos se presentan como media  $\pm$  d.e. Los valores correspondientes a los grupos A-10 y A-30 han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. La línea discontinua representa la variación de los valores de AUC teóricos en función de la dosis si el comportamiento hubiera sido lineal.

Por último, también se puede apreciar que el valor de  $Cl_T$  medio determinado en los distintos grupos experimentales presentó diferencias significativas ( $p < 10^{-4}$ ). Aunque, cabe destacar que, curiosamente, la  $t_{1/2}$  determinada en cada uno de los grupos de ensayo no presentó diferencias significativas.

Estudio B: Estudio de la linealidad farmacocinética de la DP en la rata adulta con un historial prolongado de consumo de alcohol.

a) *Niveles plasmáticos:*

Los niveles plasmáticos de DP obtenidos a los correspondientes tiempos de muestreo en los animales de los grupos B-2, B-10 y B-30 se agrupan en las Tablas 5.10 a 5.12. Junto con los valores individuales, se relacionan los valores promedio acompañados de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/kg)	RATA							Media ± d.e.
	Tiempo	1	2	3	4	5	6	
2	2	4.4	7.1	5.7	5.7	10.5	9.5	7.2 ± 2.4
2	5	2.5	3.1	3.9	3.4	5.2	5.8	4.0 ± 1.2
2	10	2.1	2.2	1.8	1.2	2.4	2.3	2.0 ± 0.4
2	15	1.1	1.1	0.8	0.9	1.6	1.3	1.1 ± 0.2
2	20	0.8	1.1	0.7	0.8	1.1	0.9	0.9 ± 0.1
2	40	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4 ± 0.07
2	60	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2 ± 0.06

**Tabla 5.10.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **2 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-2 (ratas adultas)** con un historial prolongado de **consumo de etanol**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en µg/ml.

## Resultados

Dosis (mg/Kg)	RATA							
	Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media $\pm$ d.e.
10	2	39.4	43.1	56.3	49.4	63.9	48.2	50.1 $\pm$ 8.9
10	5	28.9	25.3	38.7	33.6	32.9	27.9	31.1 $\pm$ 4.7
10	10	16.3	15.8	22.8	20.5	21.2	24.4	20.2 $\pm$ 3.4
10	15	11.4	12.1	17.2	18.8	9.7	16.4	14.3 $\pm$ 3.6
10	20	6.5	8.9	13.6	12.5	9.6	13.0	10.7 $\pm$ 2.8
10	40	3.2	3.1	4.3	3.3	4.0	4.3	3.7 $\pm$ 0.5
10	60	1.4	1.4	3.4	2.1	2.5	2.7	2.3 $\pm$ 0.8
10	120	0.8	0.7	0.9	0.8	1.5	0.6	0.9 $\pm$ 0.3

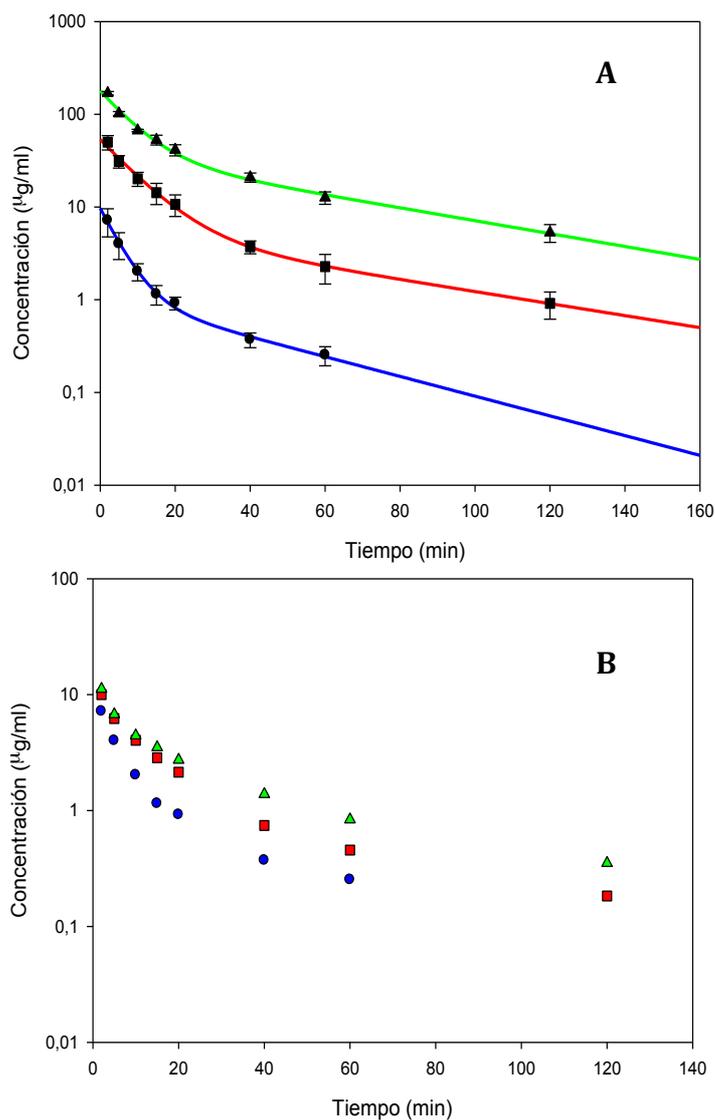
**Tabla 5.11.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **10 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-10 (ratas adultas)** con un historial prolongado de **consumo de etanol**). Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en  $\mu\text{g/ml}$ .

Dosis (mg/kg)	RATA							
	Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media $\pm$ d.e.
30	2	163.4	161.9	182.5	168.9	170.0	166.4	168.9 $\pm$ 7.3
30	5	106.5	105.9	102.1	104.4	92.7	100.8	101.1 $\pm$ 5.1
30	10	65.1	65.1	66.1	66.9	69.6	68.8	66.9 $\pm$ 1.9
30	15	60.9	49.5	47.4	45.5	59.1	55.5	52.9 $\pm$ 6.4
30	20	42.0	39.5	39.7	34.5	40.5	51.6	41.3 $\pm$ 5.6
30	40	19.1	18.7	20.7	19.3	23.4	24.3	20.9 $\pm$ 2.3
30	60	13.1	9.8	12.5	11.5	15.7	13.0	12.6 $\pm$ 1.8
30	120	4.3	4.8	5.2	5.2	7.6	4.8	5.3 $\pm$ 1.1

**Tabla 5.12.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **30 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-30 (ratas adultas)** con un historial prolongado de **consumo de etanol**). Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en  $\mu\text{g/ml}$ .

En la Figura 5.37 (A) se representan las curvas de nivel plasmático promedio correspondientes a las dosis de 2, 10 y 30 mg/kg de DP obtenidas en **ratas adultas** con un historial prolongado de **consumo de etanol**. En el apartado (B) se representan los niveles plasmáticos promedio obtenidos en estos tres grupos experimentales, en la que los valores correspondientes a los **B-10 y B-30** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. Como se puede observar, los niveles plasmáticos normalizados no se superponen, hecho que sugiere la existencia de un comportamiento **NO LINEAL** en la farmacocinética de la DP en el ámbito de dosis ensayadas.

## Resultados



**Figura 5.37. A)** Concentraciones plasmáticas promedio obtenidas para los **grupos B-2, B-10 y B-30** tras la administración de una dosis de **2** (círculo, trazo azul), **10** (cuadrado, trazo rojo) y **30** (triángulo, trazo verde) **mg/kg de DP** respectivamente. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del ajuste, mediante regresión no lineal, de una ecuación biexponencial compartimental a los datos plasmáticos promedio. **(B)** Representación gráfica de los niveles plasmáticos promedio obtenidos para los **grupos B-2** (círculo azul), **B-10** (cuadrado rojo) y **B-30** (triángulo verde), donde los valores correspondientes a los **grupos B-10 y B-30** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas.

b) *Parámetros farmacocinéticos:*

En las tablas 5.13 a 5.15 se resumen los parámetros farmacocinéticos individuales y promedios obtenidos para la DP en los grupos experimentales B-2, B-10 y B-30. Cada valor promedio va acompañado de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/kg)	Parámetro	RATA						Media ± d.e.
		1	2	3	4	5	6	
2	$A_0$ μg/ml	4.32	9.05	7.91	8.44	12.09	13.35	9.19 ± 3.21
2	$\alpha$ min <sup>-1</sup>	0.10	0.31	0.20	0.30	0.19	0.22	0.22 ± 0.08
2	$B_0$ μg/ml	0.37	1.85	0.70	1.33	1.04	1.21	1.08 ± 0.52
2	$\beta$ min <sup>-1</sup>	0.011	0.035	0.015	0.036	0.021	0.024	0.024 ± 0.010
2	$t_{1/2}$ (min)	63.83	19.57	45.27	19.47	33.31	29.50	35.15 ± 17.02
2	$CL_T$ (ml/min)	15.13	15.48	15.27	22.34	9.24	11.07	14.76 ± 4.53
2	$AUC_0^{\infty}$ (μg.min/ml)	66.14	64.64	65.56	44.80	108.31	90.40	73.30 ± 22.43

**Tabla 5.13.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.10, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **2 mg/kg** del fármaco en animales **adultos** con un historial prolongado de **consumo de etanol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

## Resultados

Dosis (mg/kg)	Parámetro	RATA						Media ± d.e.
		1	2	3	4	5	6	
10	$A_0$ μg/ml	44.33	37.83	56.06	50.02	67.66	39.69	49.26 ± 11.24
10	$\alpha$ min <sup>-1</sup>	0.11	0.09	0.12	0.09	0.16	0.09	0.11 ± 0.02
10	$B_0$ μg/ml	3.16	2.18	9.17	3.60	5.75	8.83	5.45 ± 2.99
10	$\beta$ min <sup>-1</sup>	0.012	0.009	0.019	0.012	0.017	0.022	0.015 ± 0.004
10	$t_{1/2}$ (min)	59.75	75.02	37.27	56.35	41.51	32.09	50.33 ± 16.22
10	$CL_T$ (ml/min)	6.32	8.02	6.29	7.54	8.61	7.10	7.31 ± 10.93
10	$AUC_0^\infty$ (μg.min/ml)	664.71	677.87	976.29	852.57	778.03	839.27	798.12 ± 117.52
10	$AUC_0^\infty(N)$ (μg.min/ml)	158.4	124.7	159.2	132.7	116.2	140.9	138.7 ± 17.6

**Tabla 5.14.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.11, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **10 mg/kg** del fármaco en animales **adultos** con un historial prolongado de **etanol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/kg)	Parámetro	RATA						Media $\pm$ d.e.
		1	2	3	4	5	6	
30	$A_0$ $\mu\text{g/ml}$	137.70	146.00	166.30	166.50	131.90	121.20	144.9 $\pm$ 18.48
30	$\alpha$ $\text{min}^{-1}$	0.12	0.10	0.15	0.14	0.12	0.11	0.12 $\pm$ 0.01
30	$B_0$ $\mu\text{g/ml}$	39.16	24.34	38.53	31.60	36.25	43.60	35.6 $\pm$ 6.76
30	$\beta$ $\text{min}^{-1}$	0.018	0.014	0.017	0.015	0.013	0.019	0.016 $\pm$ 0.002
30	$t_{1/2}$ (min)	37.67	50.23	40.70	45.22	52.51	37.33	43.94 $\pm$ 6.45
30	$CL_T$ (ml/min)	5.22	5.89	4.88	4.82	5.00	5.21	5.17 $\pm$ 0.39
30	$AUC_0^\infty$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$ )	3296.20	3167.61	3356.56	3250.60	3873.56	3455.73	3400.05 $\pm$ 251.53
30	$AUC_0^\infty(N)$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$ )	191.6	169.9	205.1	207.8	200.1	192.2	194.4 $\pm$ 13.7

**Tabla 5.15.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.12, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **30 mg/kg** del fármaco en animales **adultos** con un historial prolongado de **consumo de etanol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

## Resultados

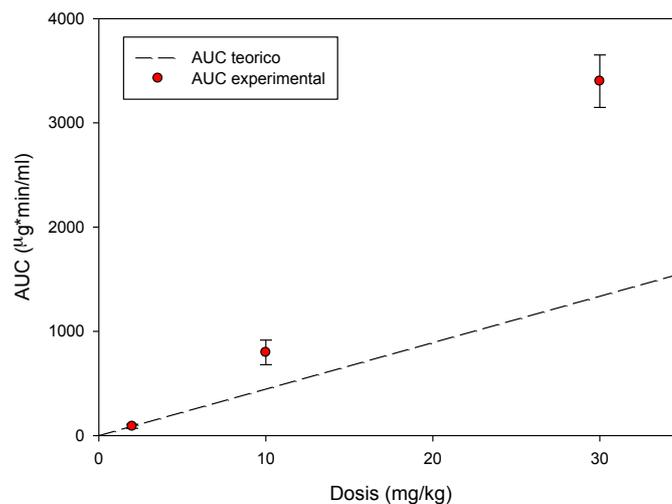
### c) Análisis estadístico de los resultados:

La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos de la DP calculados para los distintos grupos experimentales se resumen en la Tabla 5.16.

DOSIS (mg/Kg)	Cl <sub>T</sub> (ml/min)	t <sub>1/2</sub> (min)	AUC <sub>0</sub> <sup>∞(N)</sup> (μg. min/ml)
2	14.76±4.5 a	35.1±17.0	73.3±22.4 a
10	7.31±0.9 b	50.3±16.2	138.7±17.6 b
30	5.17±0.4 b	43.9±6.4	194.4±13.7 c
Significación	p<10 <sup>-4</sup>	n.s.	p<10 <sup>-4</sup>

**Tabla 5.16.** Resultados del ANOVA realizado sobre los principales farmacocinéticos de la DP en la rata adulta **con un historial prolongado de consumo de etanol**. Los valores de AUC<sub>0</sub><sup>∞(N)</sup> correspondientes a los grupos B-10 y B-30 han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. Aquellos valores con distintos superíndices presentan diferencias significativas entre ellos (p<0.05).

Los resultados indican que la disposición de la DP en ratas Wistar **adultas** que han estado expuestas de **manera prolongada** al alcohol, es claramente **no lineal** en el ámbito de dosis estudiadas. Como ha ocurrido en el estudio anterior, los valores de AUC<sub>0</sub><sup>∞</sup> no aumentan de forma lineal a medida que aumenta la dosis administrada, es decir se han detectado diferencias estadísticamente significativas en los valores normalizados en función de la dosis administrada (p<10<sup>-4</sup>). Además, en la Figura 5.38 se representan gráficamente los valores de AUC obtenidos experimentalmente en función de la dosis administrada. En esta gráfica, se incluye la línea correspondiente a los valores de AUC que hipotéticamente se obtendrían si no existieran pérdidas de linealidad (AUC teórico).



**Figura 5.38.** Representación gráfica de los valores de  $AUC_0^\infty$  obtenidos de forma experimental correspondientes a los grupos B-2, B-10 y B-30 (puntos rojos). Los datos se presentan como media  $\pm$  d.e. Los valores correspondientes a los grupos B-10 y B-30 han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. La línea discontinua representa la variación de los valores de AUC teóricos en función de la dosis si el comportamiento hubiera sido lineal.

Por último, también se puede apreciar que el  $Cl_T$  medio obtenido en los distintos grupos experimentales presentó diferencias significativas ( $p < 10^{-4}$ ). Sin embargo, cabe destacar que, curiosamente, la  $t_{1/2}$  determinada en cada uno de los grupos de ensayo no presentó diferencias significativas.

## Resultados

- Estudio C: Influencia del consumo prolongado de etanol en la disposición de la DP.

Los niveles plasmáticos de DP obtenidos a los correspondientes tiempos de muestreo en los animales del **grupo Control** se resumen en la Tabla 5.17. Junto con los valores individuales, se relacionan los valores promedio acompañados de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/Kg)	Tiempo	RATA				Media ± d.e.
		1	2	3	4	
10	2	38.9	44.4	39.0	35.9	39.5 ± 3.4
10	5	22.7	24.7	16.2	14.2	19.4 ± 5.0
10	10	16.8	17.0	14.2	7.3	13. ± 4.5
10	15	8.5	10.9	4.4	6.6	7.6 ± 2.7
10	20	6.2	6.8	3.3	4.8	5.3 ± 1.5
10	40	2.6	4.7	1.7	2.1	2.8 ± 1.3
10	60	1.3	3.0	0.8	1.3	1.6 ± 0.9
10	120	0.4	1.4	0.5	0.8	0.8 ± 0.4

**Tabla 5.17.** Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa rápida, de una dosis de **10 mg/kg de DP**, en solución acuosa, a los animales del **grupo Control (ratas adultas sin experiencia previa en el consumo de alcohol)**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en µg/ml.

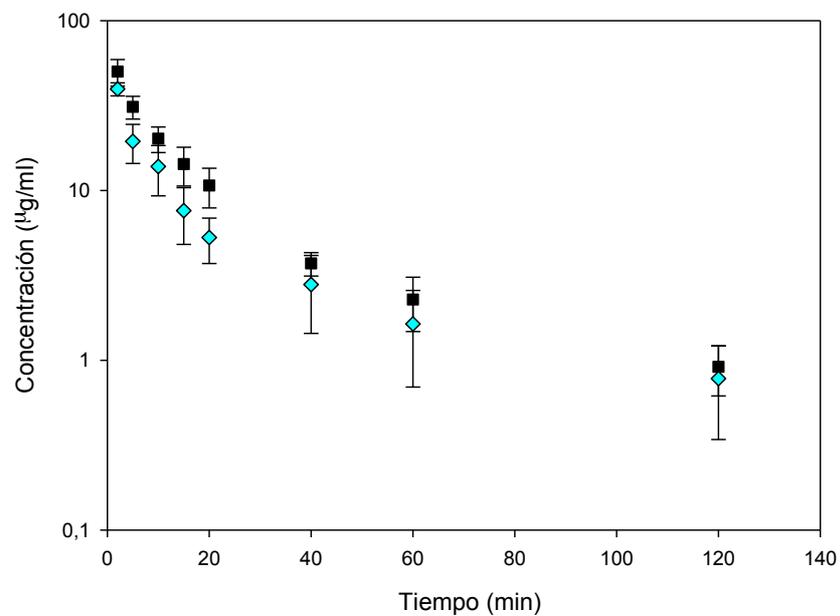
En la tabla 5.18 se muestran los parámetros farmacocinéticos individuales y promedios obtenidos para la DP en el **grupo Control**. Cada valor promedio va acompañado de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Dosis (mg/Kg)	Parámetro	RATA				Media ± d.e.
		1	2	3	4	
10	Ao μg/m	40.52	43.80	41.89	27.55	38.44 ± 7.38
10	α min <sup>-1</sup>	0.13	0.14	0.17	0.15	0.15 ± 0.01
10	Bo μg/m	4.89	5.00	2.27	3.02	3.79 ± 1.36
10	β min <sup>-1</sup>	0.019	0.018	0.015	0.014	0.016 ± 0.004
10	t <sub>1/2</sub> (min)	33.94	33.65	50.97	62.45	45.25 ± 14.03
10	CL <sub>T</sub> (ml/min)	8.38	11.55	14.39	9.71	11.01 ± 2.61
10	AUC <sub>0</sub> <sup>∞</sup> (μg.min/ml)	544.72	556.25	409.75	459.22	492.48 ± 70.11
10	AUC <sub>0</sub> <sup>∞(N)</sup> (μg.min/ml)	119.3	86.6	69.5	103.1	94.6 ± 21.4

**Tabla 5.18.** Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios de la DP, calculados a partir de los ajustados de una ecuación biexponencial a los valores experimentales expuestos en la Tabla 5.17, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **10 mg/kg** del fármaco en la rata **adulta sin experiencia previa en el consumo de alcohol**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

## Resultados

En la Figura 5.39 se representan las curvas de nivel plasmático promedio correspondientes al **grupo B-10** (rata adulta con un historial prolongado de consumo de etanol) y **grupo Control** (rata adulta sin experiencia previa en el consumo de alcohol).



**Figura 5.39.** Curvas de nivel plasmático promedio ( $\pm$  d.e.) obtenidas para los grupos **B-10** (cuadro negro) y **Control** (rombo azul) tras la administración de una dosis de 10 mg/kg de DP).

La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos de la DP calculados en los grupos experimentales **B-10** y **Control** se resumen en la Tabla 5.19.

GRUPO	EDAD	CONSUMO ETANOL	DOSIS (mg/Kg)	Cl <sub>T</sub> (ml/min)	t <sub>1/2</sub> (min)	AUC <sub>0</sub> <sup>∞</sup> (μg*min/ml)
B-10	ADULTA	SÍ	10	7.3±0.9	50.3±16.2	798.12±117.53
CONTROL	ADULTA	NO	10	11.0±2.6	45.2±14.0	492.48±70.11
Significación				p=0.011	n.s.	p=0.02

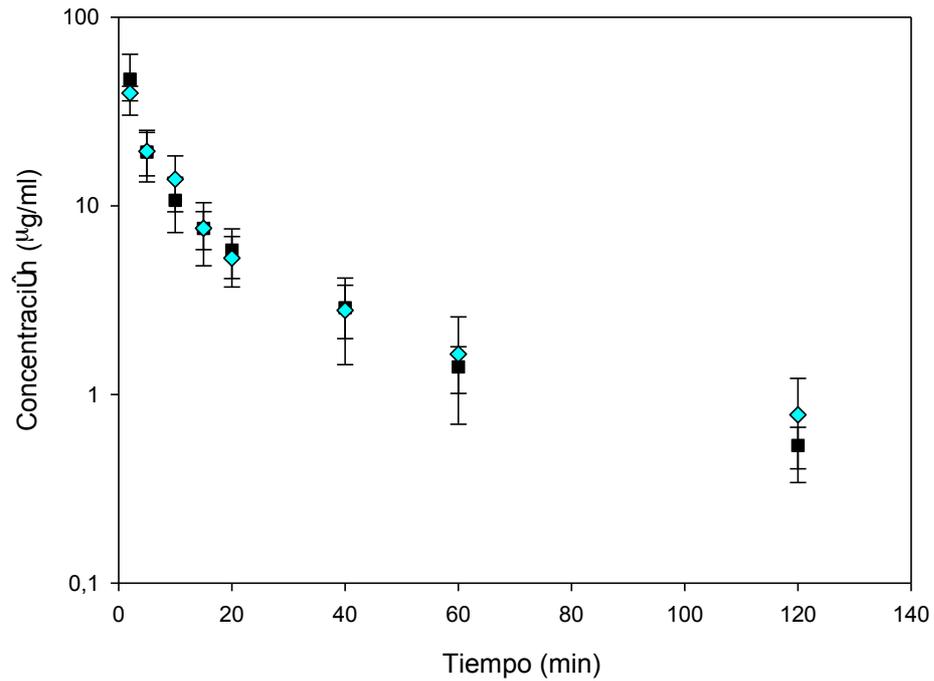
**Tabla 5.19.** Resultados del ANOVA realizado sobre los principales farmacocinéticos de la DP obtenidos en el **grupo B-10** (rata **adulta** con un **historial prolongado de consumo** de etanol) y en el **grupo Control** (rata **adulta** que **nunca ha consumido etanol**); n.s.: diferencias estadísticamente no significativas.

Como se puede observar, un **consumo prolongado de etanol** por parte del animal conlleva una serie de **cambios en la disposición de la DP** en la rata. El análisis estadístico detectó la existencia de diferencias significativas tanto en el Cl<sub>T</sub> del fármaco (p=0.011) como, consiguientemente, en el AUC<sub>0</sub><sup>∞</sup> (p=0.02). En concreto, el consumo prolongado de alcohol ha provocado en una reducción del Cl<sub>T</sub> de la DP de casi un 40%, pasando de valores de aproximadamente 11.0 ml/min a valores alrededor de 7.3 ml/min. Por último, cabe destacar que, de nuevo, la t<sub>1/2</sub> determinada en los dos grupos experimentales comparados, no presentó diferencias significativas.

## Resultados

### ➤ Estudio D: Influencia de la edad del animal en la disposición de la DP.

En la Figura 5.40 se representan las curvas de nivel plasmático promedio correspondientes al **grupo A-10** (rata adolescente / nunca ha consumido etanol) y **grupo Control** (rata adulta / nunca ha consumido etanol).



**Figura 5.40.** Curvas de nivel plasmático promedio ( $\pm$  d.e.) obtenidas para los grupos **A-10** (cuadro negro) y **Control** (rombo azul) tras la administración de una dosis de **10 mg/kg de DP**.

La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos de la DP calculados para los distintos grupos experimentales se resumen en la Tabla 5.20.

GRUPO	EDAD	DOSIS (mg/Kg)	Cl <sub>T</sub> ml/min	Cl <sub>T</sub> /kg ml/min/Kg	t <sub>1/2</sub> (min)	AUC <sub>0</sub> <sup>∞</sup> (µg *min/ml)
A-10	ADOLESCENTE	10	6.3±1.0	19.8±4.8	32.7±9.8	537.0±151.8
CONTROL	ADULTO	10	11.0±2.6	20.6±3.0	45.2±14.0	492.5±70.1
Significación			p=0.002	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabla 5.20.** Resultados del ANOVA realizado sobre los principales farmacocinéticos de la DP en el grupo **A-10** (rata **adolescente**) y en el grupo **Control** (rata **adulta**). Los animales pertenecientes ambos grupos experimentales **nunca habían consumido alcohol**. n.s. : diferencias estadísticamente no significativas.

De los parámetros farmacocinéticos calculados, sólo el Cl<sub>T</sub> presentó diferencias significativas entre los dos grupos ensayados. Esta diferencia es completamente lógica a tenor de la diferencia de peso corporal mostrada por los animales pertenecientes al grupo A-10 y al grupo Control, aspecto que influye decisivamente en el valor de este parámetro. Para el resto de parámetros estudiados –aclaramiento total normalizado por el peso corporal del animal (Cl<sub>T</sub>/kg), semivida de eliminación (t<sub>1/2</sub>) y área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC<sub>0</sub><sup>∞</sup>)- el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. Es decir, **estos resultados demuestran que la disposición del fármaco no se verá modificada a medida que el animal vaya madurando, al menos en el ámbito de edades estudiado.**



## 6 DISCUSIÓN



## 6.1 Caracterización del modelo experimental empleado

El hallazgo de Richter y Campbell en 1940 de que las ratas consumían alcohol de forma voluntaria supuso un punto de partida para la creación de modelos animales utilizables en los estudios relacionados con el alcoholismo (Richter y col., 1940). En este sentido, se han desarrollado modelos en roedores que permiten analizar con cierta aproximación algunos rasgos del comportamiento adictivo en humanos como el deseo compulsivo por el consumo, la pérdida de control durante el consumo o el fenómeno de la recaída, y que ha convertido a estos modelos animales en una herramienta ideal para la búsqueda de nuevas farmacoterapias para el alcoholismo (Giselle V. Kamenetzky y col., 2005; Spanagel y col., 2000; Spanagel, 2000; Spanagel y col., 2008).

En lo referente a los modelos animales empleados en el análisis de la recaída, en la actualidad se utilizan fundamentalmente dos: los **modelos de reanudación** y los **modelos** donde se **evalúa el fenómeno ADE** (descritos con detalle en el apartado de Antecedentes de esta Memoria).

Existen muchos autores que consideran a los **modelos de reanudación** como una herramienta útil para el estudio de los comportamientos de búsqueda de la droga y de recaída en el consumo de alcohol (Rodd y col., 2004; Spanagel, 2003). Estos modelos han demostrado su *validez predictiva*, ya que dos fármacos actualmente utilizados en clínica, como la naltrexona y el acamprosato, son capaces de suprimir la reanudación tras una fase de extinción (Bachteler y col., 2005; Katner y col., 1999). Además, ciertas condiciones capaces de provocar la recaída en humanos (como pistas o estímulos ambientales previamente asociados a la droga o situaciones estresantes) han sido capaces de reanudar el comportamiento de búsqueda en diversos estudios preclínicos (Self y col., 1998b; Shaham y col., 2000). Sin embargo, teniendo en cuenta la definición de recaída dada en el Capítulo de Antecedentes de la presente Memoria, otros autores consideran la reanudación como un modelo válido sólo para el estudio del comportamiento

## Discusión

de búsqueda de la droga, pero no para el análisis de la recaída, ya que: 1) no existe un periodo de abstinencia propiamente dicho (el animal sigue ejecutando las mismas tareas para conseguir la droga, aunque no lo consiga) y 2) la fase de reanudación se produce sin que el animal vuelva a recibir la droga, por lo que no se producen los efectos psicoactivos asociados con su ingesta (Conklin y col., 2002; Sanchis-Segura y col., 2006; Shaham y col., 2003). Por ello, este tipo de modelos carecen de lo que se conoce como *validez de constructo*, es decir, su semejanza con el comportamiento humano es limitada. Además, en diversos estudios se ha observado que estímulos que nunca fueron apareados con la droga (ej: sonido, un bebedero vacío o claves visuales), no provocaron ningún efecto, pero la presentación de una solución de alcohol 8% sí es capaz de desencadenar la reanudación. Estos autores sugieren que estímulos como el olor y el sabor actúan como estímulos discriminativos y reinstauran la respuesta (Bienkowski y col., 1999b).

Un modelo alternativo para evaluar el comportamiento de recaída es el que emplea animales sometidos a un periodo prolongado de consumo, siempre voluntario, de alcohol en el que se intercalan, de forma aleatoria, varios periodos de abstinencia. Tras estos periodos de abstinencia forzada, los animales muestran un aumento pronunciado y temporal del consumo de alcohol, fenómeno que se ha denominado ADE (siglas de *Alcohol Deprivation Effect* en la terminología anglosajona). Aunque este fenómeno fue descrito por primera vez en los años 60 (Le Magnen J, 1960; Sinclair y col., 1967) su uso para el estudio del fenómeno de la recaída es más reciente. De hecho, en los últimos años han proliferado los estudios que utilizan este fenómeno para evaluar algunos aspectos de la recaída no evaluables con los modelos de reanudación (Le y col., 2002b). Se puede considerar el modelo ADE como un modelo de recaída, ya que permite que el individuo acceda de forma voluntaria al etanol tras un periodo de abstinencia prolongado (Sanchis-Segura y col., 2006). Sin embargo, no están claras cuáles son las causas exactas que conducen o desencadenan la recaída en este modelo. Se podría

considerar que el olor o sabor del alcohol actúan como pistas asociadas, que la propia droga desencadene la recaída a través del llamado efecto *priming*, o bien podrían ser ambas causas (Sanchis-Segura y col., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que el modelo ADE presenta una gran semejanza con el comportamiento de los humanos, confiriéndole *validez de constructo*. Es muy común que los pacientes alcohólicos interrumpen los periodos de abstinencia, recayendo en un episodio de consumo desmesurado de forma temporal hasta que se vuelven a controlar (Larimer y col., 1999). Además, el ADE también se asemeja al consumo descontrolado de los bebedores sociales (individuos no alcohólicos que ingieren alcohol de forma masiva en ocasiones puntuales como cumpleaños, bodas, etc). Por otra parte, el hecho de que naltrexona y acamprosato, dos fármacos actualmente comercializados para el tratamiento del alcoholismo, sean capaces de reducir de forma efectiva el ADE, otorga *validez predictiva* a este tipo de modelos y permite asumir, al menos inicialmente, que los mecanismos que dan lugar a la aparición del fenómeno ADE son similares en humanos y roedores, convirtiendo este modelo en una herramienta útil para la evaluación preclínica de nuevas moléculas con posible actividad antirecaída.

Desde el punto de vista metodológico, debemos destacar algunas características cruciales de este modelo. La primera y fundamental, es que se evalúan las pautas de ingesta a lo largo de un **periodo prolongado de consumo voluntario de etanol**. Este hecho es crucial pues algunos autores consideran que el alcohol, dado su carácter de “reforzador débil”, tarda más en desarrollar en los seres humanos la sintomatología propia de la dependencia a las drogas. Además, se ha demostrado que determinados rasgos conductuales propios de la adicción sólo aparecen en sujetos con una dilatada experiencia en el consumo de la droga (Ahmed, 2005; Deroche-Gamonet y col., 2004; Vanderschuren y col., 2004; Vanderschuren y col., 2005). La voluntariedad del consumo en el modelo supone una característica

## Discusión

adicional a valorar: el problema de la adicción en humanos implica, al menos inicialmente, un comportamiento voluntario, por lo que este modelo animal de consumo voluntario parece reflejar de un modo más fidedigno los patrones de ingesta que se van desarrollando cuando se tiene acceso libre a la bebida. Otra característica del modelo empleado en esta Memoria es la relacionada con la **introducción de varias fases de abstinencia de diferente duración de forma aleatoria**. Existen evidencias que demuestran que la inclusión de diferentes periodos de abstinencia a lo largo de la exposición de los animales a la droga, además de facilitar la adquisición de la conducta adictiva en animales con un historial de consumo prolongado, puede contribuir a la aparición del *craving* (un aumento en la motivación por consumir alcohol) y la consecuente recaída, ya que durante las fases de abstinencia, los animales experimentan un incremento en la irritabilidad y la ansiedad (Sanchis-Segura y col., 2006). La aparición y la duración aleatoria de las diferentes fases de abstinencia impiden que el animal pueda predecir su aparición y, por tanto, evita readaptaciones conductuales que pueden desvirtuar los resultados de los experimentos que emplean estos modelos.

**La introducción de varias disoluciones de etanol de diferente concentración es otro rasgo que caracteriza este modelo** y que, aun no siendo fundamental, otorga varias ventajas, que a continuación comentamos. Distintas evidencias indican que los roedores son cautos en el consumo de sustancias con sabores novedosos, un fenómeno denominado neofobia, y que inicialmente supone una dificultad para inducir el consumo de alcohol en estos animales (Giselle V. Kamenetzky y col., 2005). Para solventar esta dificultad, se han desarrollado varias alternativas. Una posibilidad es ofrecerles una botella con agua y otra con una disolución con una baja concentración de etanol que es incrementada poco a poco a lo largo de los días. Otra ha sido mezclar inicialmente el alcohol en el agua de bebida conjuntamente con alguna sustancia altamente palatable (normalmente edulcorantes como la sacarosa o la sacarina) para posteriormente ir disminuyendo la concentración de la sustancia edulcorante hasta hacerla

desaparecer, dejando únicamente al etanol en el agua (Samson y col., 1999). Spanagel y sus colaboradores han contemplado una posibilidad adicional que ha consistido en inducir el consumo y evaluar la preferencia por el etanol ofreciendo a los animales desde el comienzo de la exposición a la droga, tres botellas conteniendo disoluciones de etanol a diferentes concentraciones (por ejemplo etanol 5, 10 y 20% (v/v)) y una cuarta botella con agua (el llamado **paradigma de cuatro botellas**). Siguiendo estas pautas, los animales se inician, paradójicamente, consumiendo elevadas dosis de etanol. Es más, estos autores demostraron que este paradigma de las cuatro botellas suponía una mejora respecto al paradigma de dos botellas (en el cual se ofrecía una botella con agua y otra con etanol al 10% (v/v)) utilizado hasta la fecha, ya que el consumo de etanol en el paradigma de las cuatro botellas demostró ser claramente superior (Spanagel y col., 1999). Estos mismos autores explican que en el paradigma de dos botellas la concentración de alcohol es demasiado elevada para los animales, sobre todo en las etapas iniciales, en las cuales los animales tienen una clara preferencia por la solución del 5%. Sin embargo, con el paradigma de cuatro botellas se evita esa aversión inicial hacia el alcohol y los roedores pueden ir incrementando voluntaria y progresivamente la ingesta procedente de las disoluciones con mayor concentración etanólica.

No obstante lo anterior, se ha de remarcar que este modelo de recaída basado en la medición del ADE también presenta algunos inconvenientes: 1) aunque ha demostrado su consistencia en diversas cepas de rata, no ha sido así en ratones y hamsters (Rainer Spanagel y col., 2003,; Sinclair y col., 1973b), 2) debido a que los periodos de abstinencia son forzados, también se ha criticado que los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la recaída pudieran diferir de los involucrados cuando este fenómeno está bajo el control del sujeto.

En la presente Tesis Doctoral, decidimos evaluar la eficacia antirecaída de la DP y su combinación con NTX a través de la medición del fenómeno

## *Discusión*

ADE, utilizando el modelo animal basado en el paradigma de las cuatro botellas ampliamente empleado por el grupo de R. Spanagel (Spanagel y col., 1999). Así pues, utilizando esta metodología hemos analizado las pautas de **consumo voluntario de etanol a lo largo de un periodo prolongado de medición** en el que hemos introducido aleatoriamente **fases de abstinencia de diferente duración**. Concretamente, en nuestro diseño experimental los animales han estado sujetos a un total de 30 semanas de ingesta voluntaria de etanol y a 12 semanas de abstinencia, repartidas de **forma aleatoria** en cinco periodos de diferente duración, tal y como recomiendan Spanagel y Hölter (Spanagel y col., 1999).

En primer lugar, se procedió a la caracterización del modelo en nuestras condiciones experimentales y utilizando los animales (ratas de la raza Wistar) de nuestra colonia. Tal y como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos de la presente Tesis Doctoral, sólo se incluyeron en los diferentes estudios farmacológicos aquellos animales que cumplieron dos requisitos. El primero de ellos tuvo en cuenta la magnitud del ADE. Así, se asumió que se producía el fenómeno ADE cuando el incremento en el consumo de etanol del animal en los días post-abstinencia superaba al menos el 150% del su consumo basal. Este primer criterio se definió en base al incremento habitual obtenido (expresado como porcentaje) en los resultados publicados por el grupo de referencia (Holter y col., 2000; Perreau-Lenz y col., 2012; Vengeliene y col., 2005; Vengeliene y col., 2006; Vengeliene y col., 2007). Como segundo criterio se consideró el número de veces que un determinado animal manifestaba ADE a lo largo de su historial de consumo. Se asumió que el animal, para incluirse en un experimento concreto, debía haber manifestado el fenómeno ADE (según el criterio anterior) en, al menos, 3 de las 4 ocasiones en las que había sido sometido a un proceso de abstinencia y posterior reintroducción del alcohol.

El comportamiento observado en los animales de nuestra colonia en lo relativo a 1) la magnitud de los ADE evaluados, 2) la preferencia por las

distintas disoluciones de etanol e, incluso, 3) los cambios de preferencia detectados tras los periodos de abstinencia es, en líneas generales, cualitativamente similar al obtenido por el grupo de referencia que también utiliza la rata Wistar. Así tras cada periodo de abstinencia y la posterior reintroducción del etanol, los niveles de ingesta aumentaron en nuestros animales de forma temporal permitiendo **detectar y evaluar globalmente el fenómeno ADE** (ver Figura 5.2). Aunque la magnitud de los incrementos, medidos en términos absolutos, pareció diferir de un ADE a otro, cuando los cambios se expresaron como porcentaje del consumo basal se pudo comprobar que el porcentaje de aumento fue muy similar independientemente del ADE considerado. Las diferencias observadas entre la magnitud absoluta de los diferentes ADE evaluados, se podrían explicar por el progresivo descenso en el consumo basal de alcohol mostrado por los animales a lo largo de todo el procedimiento experimental (ver Figura 5.1). Algunos autores apuntan que este hecho se debe a que durante la fase de adquisición, en las primeras semanas de exposición al alcohol, la ingesta suele ser de tipo exploratorio con niveles de consumo diarios inestables e impredecibles (Giselle V. Kamenetzky y col., 2005). Probablemente, en este estadio los animales aprenden a evaluar los efectos psicotrópicos del alcohol y ajustar su comportamiento de consumo. En cualquier caso, no se detectaron diferencias significativas entre la magnitud absoluta del ADE 3 y ADE 4 para ninguno de los 4 días post-abstinencia. Es decir, **una vez experimentados varios episodios de abstinencia (2 en nuestras condiciones experimentales) y tras un tiempo prolongado de experiencia con el alcohol, los animales manifiestan un fenómeno ADE reproducible**. Éste hecho nos impulsó a diseñar nuestros experimentos de evaluación de la eficacia antirecaída de los diferentes tratamientos farmacológicos tras el quinto periodo de abstinencia, momento en el que los animales ya manifiestan un comportamiento de ingesta más reproducible en el tiempo y menos variable entre individuos.

## Discusión

Un análisis de los datos de seguimiento de la ingesta muestra que, en nuestra colonia de animales, la solución alcohólica proporcionalmente más consumida es la del 5%: aportó aproximadamente el 60 % del volumen de etanol total ingerido (Ver Figura 5.4). Por el contrario la preferencia por las soluciones al 10% y al 20% es apreciablemente menor, situándose en torno al 20% y al 15%, respectivamente (ver Figuras 5.5 y 5.6). La inspección de estas tres figuras correspondientes a la preferencia por cada una de las soluciones etanólicas, demuestra que no se produjeron cambios significativos en las preferencias por las diferentes soluciones de etanol ni entre los días pre- y post-abstinencia, ni entre los cuatro ADEs experimentados. Por tanto, a la luz de los resultados obtenidos, se puede afirmar que **la preferencia por las diferentes soluciones de etanol se ha mantenido invariable en términos generales a lo largo de los cuatro ADEs previos al tratamiento.** Sin embargo, tras cada periodo de abstinencia y la posterior reintroducción de las soluciones de etanol, la preferencia total por el etanol pasa aproximadamente de este 30-35% a aproximadamente un 70% (ver Figura 5.3). Estos datos ponen de manifiesto que los animales, tras la abstinencia y posterior reintroducción de las soluciones de etanol modifican su patrón habitual de consumo, incrementando la proporción de etanol consumido con respecto al volumen total de líquidos ingerido, es decir, que de forma temporal consumen proporcionalmente mucho más alcohol que en condiciones normales. Es importante remarcar, que estos datos no están en completa concordancia con los obtenidos por el grupo de R. Spanagel. Sus resultados indican que durante las 8 primeras semanas de ingesta de alcohol existe una clara secuencia en la preferencia por las diferentes soluciones de etanol: 5% >> 10% > 20%, la cual es similar a la obtenida en nuestra colonia de animales. Sin embargo, cuando introducen un periodo de abstinencia, observan un cambio en dicha secuencia: 5% < 10% ≤ 20% (Spanagel y col., 1999). Estos autores explican que este cambio en la preferencia de las diferentes soluciones de etanol es debido a la pérdida de control en el

consumo cuando se introduce un periodo de abstinencia (Holter y col., 1999; Holter y col., 2000; Spanagel y col., 1996; Spanagel y col., 1999).

Durante la caracterización del modelo en los animales de nuestra colonia nos pareció oportuno determinar los niveles plasmáticos de etanol. Tal y como observamos en la Figura 5.7, dichos niveles oscilaron entre  $0.075 \pm 0.01$  mg/dl y  $0.72 \pm 0.15$  mg/dl a lo largo del día. Además, hemos podido comprobar que durante las fases de ingesta nuestros animales siguen un patrón de consumo definido, bebiendo fundamentalmente durante la fase oscura: de hecho los máximos valores de alcoholemia se hallaron precisamente hacia el final del periodo de oscuridad. Holter y Spanagel, empleando un dispositivo desarrollado por ellos que les permite medir la ingesta de etanol de forma automática (el *drinkometer*<sup>®</sup>) (Spanagel y col., 1999), describieron el patrón de ingesta durante el periodo anterior (basal) y posterior a la fase de abstinencia en los animales de su colonia. El hallazgo fundamental que describieron en su artículo fue que los animales durante la fase de ingesta basal ingieren, como cabría presumir, el etanol fundamentalmente durante el periodo nocturno. Pero curiosamente los animales cambian sus patrones de ingesta tras un periodo de abstinencia, bebiendo incluso durante su periodo de inactividad (por el día).

Para finalizar con la caracterización del modelo de alcoholización a largo plazo empleado en nuestros experimentos, y aunque todos los animales empleados contaron con acceso al agua de bebida y a la alimentación sólida “ad libitum” durante todo el estudio, decidimos explorar si se producían alteraciones en el crecimiento de los animales debido al consumo crónico de etanol. Optamos para ello por la realización de un registro semanal del peso corporal en un grupo concreto de animales. Nuestros resultados indican que la evolución de los pesos de los animales en estudio, no difirió sensiblemente de la descrita por la casa comercial Harlan Laboratories Inc, para la rata Wistar hasta la 13ª semana de vida. Estos resultados sugieren que, al menos hasta la decimotercera semana de vida, el consumo voluntario de etanol en

nuestras condiciones experimentales no modificó el patrón de crecimiento normal de los animales.

## **6.2 Eficacia de la DP en la prevención del ADE**

Aunque el tratamiento del alcoholismo es un objetivo fundamental en el ámbito de la Salud Pública, la eficacia de los tratamientos actuales puede considerarse moderada (Edwards y col., 2011; Heilig y col., 2011; Leggio y col., 2010). Consecuentemente, existe un acuerdo unánime en lo referente a la necesidad de la **identificación de nuevas dianas terapéuticas** para el desarrollo de tratamientos farmacológicos más eficaces para la prevención de las recaídas. El etanol, como otras drogas de abuso, afecta de forma compleja a diferentes vías neuroquímicas del cerebro. Durante décadas, se ha intentado identificar, no sólo las vías neuronales implicadas en la recaída, sino también los cambios que provoca el etanol en estas vías y las razones que justifican la persistencia estos cambios. De hecho, muchos de los compuestos que se están desarrollando para este fin y cuya eficacia antirecaída está siendo investigada hoy día, tienen como diana alguno de los receptores para los neurotransmisores y neuromoduladores, que han sido identificados como importantes mediadores de la recaída. Desafortunadamente, muchos de los candidatos más prometedores no han conseguido progresar en su desarrollo clínico al conocerse sus importantes efectos adversos sobre otras funciones cerebrales o corporales (Leggio y col., 2010; Spanagel y col., 2012).

Como apuntamos en los Antecedentes de esta Memoria, el desarrollo de vacunas contra las drogas de abuso constituye una nueva alternativa para la prevención de la recaída de algunas drogas (Shen y col., 2012). Teóricamente, las vacunas carecen de los efectos secundarios que sí provocan algunas de las nuevas farmacoterapias en estudio, debido a que no están diseñadas para interactuar directamente con ningún sistema de

neurotransmisión. De hecho, el objetivo de las vacunas es impedir la entrada de la droga al cerebro y, consecuentemente, impedir la unión de la droga con su receptor específico a nivel cerebral. Hoy en día, se están desarrollando vacunas contra algunas de las drogas más importantes como cocaína, nicotina, opioides y metanfetamina (Shen y col., 2012). Pero, por desgracia, esta nueva estrategia aún no se ha centrado en el alcohol, probablemente por las particulares propiedades físico-químicas de esta sustancia.

El fundamento en el que se basa el uso de agentes secuestrantes del ACD para la prevención de las recaídas en el alcoholismo que se propone en la presente Memoria, se podría considerar conceptualmente equivalente al planteado en el caso de las vacunas: estos agentes están diseñados para prevenir las acciones del ACD y/o sus derivados en el cerebro. Teóricamente, estos secuestrantes del ACD no alteran ningún sistema de neurotransmisión, ni siquiera el acceso del etanol al cerebro; de hecho actúan eliminando el ACD formado tanto a nivel hepático como cerebral y, por tanto, impidiendo la activación de los circuitos neuronales implicados en la recaída.

Los datos experimentales aportados en los últimos años permiten asumir que el ACD ejerce ese papel crucial en el desencadenamiento de las propiedades reforzantes del etanol. Como se ha detallado en el capítulo de Antecedentes, existen claras evidencias que, a día de hoy, demuestran que el primer metabolito del etanol, está directamente relacionado con la activación del SMCL. Cabe destacar, los últimos estudios electrofisiológicos y neuroquímicos, en concreto los de Foddai y col. que demostraron que tanto la administración intravenosa de ACD como la de etanol son capaces de provocar una activación dosis-dependiente de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Foddai y col., 2004) y que el bloqueo de la producción de ACD lograba impedir la activación neuronal producida por el etanol aunque no la generada por el ACD. La inhibición de la catalasa cerebral (principal enzima encargada de la biotransformación a nivel cerebral del etanol) fue también

## Discusión

capaz de suprimir la activación de las neuronas del SMCL producida por el etanol (Melis y col., 2007).

A pesar de todas las evidencias científicas que muestran que el ACD formado en el cerebro tras el consumo de etanol está íntimamente relacionado con la excitación de las neuronas DA, y que sin su participación el etanol se muestra incapaz de activar el SMCL, no existen prácticamente estudios sobre la capacidad de los agentes secuestrantes del ACD para prevenir las recaídas. Recientemente, Peana y colaboradores (Peana y col., 2010) demostraron que la administración sistémica de L-cisteína atenuaba la reanudación en el consumo operante de etanol. Cabe destacar que sus resultados, obtenidos empleando el paradigma de reanudación, fueron los primeros en mostrar que los agentes secuestrantes del ACD pueden constituir una terapia útil en la prevención de las recaídas en el alcoholismo. **Los resultados presentados en la presente Memoria tratan de confirmar la utilidad de los agentes secuestrantes del ACD como posible nueva estrategia farmacológica en la prevención de las recaídas en el consumo de etanol.** En nuestro caso decidimos probar la **eficacia de la DP** por varios motivos. En primer lugar, varios estudios previos sugerían que la DP podría ser eficaz para este fin. Así, existen numerosas evidencias experimentales de distinta índole (ver Antecedentes) que demuestran que la DP es capaz de reducir las propiedades motivacionales y reforzantes del etanol. En concreto, en el momento de realizar los experimentos que constituyen la presente Tesis, nuestro grupo y otros, ya habían demostrado que la administración sistémica de DP es capaz de suprimir algunas respuestas conductuales derivadas de la formación cerebral de ACD (Marti-Prats y col., 2010). En segundo lugar, los aductos DP-ACD han sido detectados en el cerebro (Serrano y col., 2007) demostrando la capacidad de secuestro de la DP a nivel cerebral bajo condiciones *in vivo*. Este hecho es importante pues aunque la L-cisteína tiene una demostrada eficacia para secuestrar ACD en condiciones *in vitro*, algunos datos sugerían que su actividad bajo condiciones *in vivo* podía ser limitada (Nagasawa y col., 1980),

aunque ver también (Hirayama y col., 1983). Por tanto disponíamos de numerosos datos que refrendaban la capacidad de la DP para secuestrar ACD *in vivo*. Por último, el hecho de que la DP estuviese ya aprobada por la FDA y la EMEA (Food and Drug Administration y European Medicines Agency; Cuprimine®, Depen®, o Cupripen®) para el tratamiento de la enfermedad de Wilson y la artritis reumatoide, nos animó también a ensayar su eficacia preclínica en la prevención de las recaídas en el alcoholismo ya que, de ser adecuada para esta finalidad, los trámites para registrar una nueva indicación serían más sencillos.

Un aspecto fundamental en el diseño de nuestros experimentos fue la selección de la **modalidad y ruta de administración** para la DP. Dado que nuestra intención era determinar la eficacia antirecaída de esta molécula se decidió asegurar la presencia de unos niveles plasmáticos del fármaco lo más elevados posible y sin oscilaciones (un estado estacionario) a lo largo de al menos 7 días (es decir, de modo continuado desde dos días antes a la reintroducción de las disoluciones de alcohol hasta la finalización de las mediciones de ingesta en los 4 días post-reintroducción). Decidimos además que la vía de administración fuera extravascular con el fin de facilitar metodológicamente el trabajo con los animales. Ante todo, además, debía tratarse de una vía de administración que causase el mínimo estrés a los animales (recordemos que lo que se evalúa es una conducta, la ingesta de alcohol, altamente sensible a situaciones estresantes). Por otro lado, aunque no se disponía de datos concretos sobre la farmacocinética de la DP en rata, estudios previos realizados en perros y en humanos señalaban que la semivida de eliminación de este aminoácido es relativamente corta, aproximadamente de 60 minutos (Joyce y col., 1991; Kukovetz y col., 1983; Netter y col., 1987; Wiesner y col., 1981). Este hecho fue también fundamental en la elección de la modalidad de administración, pues esta semivida tan corta limita enormemente el diseño experimental y, en concreto la modalidad y periodicidad de la administración del fármaco. La vía de administración habitual de la DP en los estudios neurofarmacológicos

## Discusión

experimentales ha sido la vía intraperitoneal. Esta vía de administración ha sido muy útil para analizar la eficacia bloqueante de la DP sobre los efectos neurofarmacológicos **agudos** del etanol. Pero, dada la corta semivida del fármaco y puesto que la ingesta de etanol por parte de los animales se produce a lo largo de todo el día (se trata de un paradigma de acceso libre y voluntario), y preferentemente durante las horas nocturnas (es decir, durante su periodo de máxima actividad), la utilización de la vía intraperitoneal habría obligado a una administración excesivamente frecuente, incluso durante el periodo nocturno. Lógicamente, este hecho haría impracticable la realización del experimento. Además, la mera aplicación de repetidas inyecciones en los animales alteraría, con una elevada probabilidad, el patrón voluntario de consumo de la droga. Por todo ello, **se decidió realizar la administración de la DP mediante una infusión subcutánea a velocidad constante en la zona dorsal de la rata con ayuda de una mini bomba osmótica Alzet®**, de manera que todos los inconvenientes descritos quedasen solventados.

Empleando el *modelo ADE* como paradigma experimental, nuestros datos indican claramente que la administración subcutánea de DP a la velocidad de 1000 µg/h (DP 1000) es capaz de prevenir la aparición del ADE sin afectar ni el consumo total de líquidos ni el peso de los animales (ver Experimento 1). Este efecto preventivo es claramente dosis-dependiente ya que los animales tratados con DP a la velocidad de 250 µg/h (DP 250) mostraron el fenómeno ADE. Estos resultados son claramente alentadores y parecen confirmar nuestra hipótesis, y la de otros grupos de investigación sobre la eficacia de los agentes secuestrantes del ACD para la prevención de las recaídas. Adicionalmente, la DP también fue capaz de suprimir de forma dosis-dependiente el incremento en la preferencia por el etanol que se produce tras el periodo de abstinencia. Dado que la ingesta total de líquidos no pareció variar significativamente respecto al grupo control, estos resultados parecen sugerir que el efecto de la DP es específico. En nuestra opinión, además, la ausencia de ADE en el grupo tratado con DP 1000 no puede atribuirse a una disminución en la actividad motora de los animales

puesto que: a) los animales ingirieron el mismo volumen total de líquidos que los animales control o los tratados con DP 250 y b) en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Marti-Prats y col., 2013) y en otros (Font y col., 2006a) se pudo demostrar que la administración sistémica (i.p.) de DP 50 mg/kg no afectaba la actividad motora basal de los animales, a pesar de que esta dosis de DP origina unos niveles plasmáticos claramente superiores (en torno a 60 µg/ml a los 5 minutos, resultados no publicados) a los obtenidos tras nuestra administración subcutánea de DP (3–4 µg/ml, ver tabla 6.1). El bloqueo del ADE provocado por la DP en nuestras condiciones experimentales tampoco pueden atribuirse a cambios en el patrón de ingesta de los animales debidos a estrés postquirúrgico ya que, tal y como se observa en la Figura 5.12, tanto el perfil como la magnitud del fenómeno ADE en el grupo vehículo tras el quinto periodo de abstinencia (ADE 5) son claramente superponibles a los observados tras el periodo de abstinencia anterior (ADE 4), en el que los animales no habían sido sometidos a ningún tipo de cirugía.

Un aspecto controvertido cuando se emplea DP en los estudios encaminados a determinar la ingesta de alcohol en animales de experimentación ha sido la alteración en la palatabilidad que este aminoácido parece producir, sobre todo a dosis altas. Hipotéticamente una alteración del sabor de las disoluciones alcohólicas (haciéndolas aversivas) percibido por los animales tratados con DP 1000, podría explicar el cambio de preferencia observado en nuestro experimento así como la ausencia de ADE. Estudios previos han demostrado claramente que la administración sistémica de DP puede producir cambios en la percepción del sabor de distintos fluidos (edulcorados o no) y de la comida. Así, este cambio en la palatabilidad fue mostrado tanto para el etanol como para la sacarosa en disolución acuosa en roedores (Font y col., 2006b) cuando se administraba el aminoácido intraperitonealmente a la dosis de 50 mg/kg. Es cierto, que tal como indicamos antes, los niveles plasmáticos de DP tras la administración sistémica de DP 1000 son claramente inferiores a los observados tras la

## *Discusión*

administración por vía ip de 50 mg/kg, pero la posibilidad, más que razonable, de que una alteración en la percepción de los sabores (por tanto, un efecto inespecífico, en nada relacionado con el secuestro del ACD) fuese la responsable de los resultados obtenidos a nivel de la prevención del ADE, nos obligó a plantear algunas experiencia adicionales que nos permitieran certificar la especificidad de los efectos de la DP. Por una parte, se intentó evaluar la influencia de la administración sistémica de DP (1000 µg/h) sobre la preferencia por una solución azucarada en los animales de nuestra colonia utilizando un paradigma descrito anteriormente. Se pudo comprobar, a través de los resultados de este experimento, que la administración subcutánea de DP provoca una reducción significativa en dicha preferencia, aunque no se observaron cambios significativos en la ingesta de comida.

De acuerdo con literatura, los animales con un largo historial de consumo de etanol siguen manifestando el fenómeno ADE tras la abstinencia aunque la reintroducción de las soluciones de etanol incorpore quinina (una sustancia que produce una fuerte aversión en ratas (Aravich y col., 1980; Wolffgramm y col., 1991) o sacarosa (que claramente la hace más palatable para la rata (Spanagel y col., 1999). Estos datos sugieren que el alcohol ejerce efectos específicos (independientes del estado nutricional o de las características organolépticas de las disoluciones ofrecidas a los animales (Dole, 1986) que conducen, tras la abstinencia, a una búsqueda descontrolada de la droga y a un incremento transitorio de su ingesta. En este punto, algunos investigadores, entre los que nos encontramos, se plantearon comprobar la eficacia de la DP administrada a nivel central, de manera que se pudiera excluir su efecto en la palatabilidad. Font y colaboradores, pudieron demostrar que la administración intracerebroventricular de DP produce una disminución en el consumo voluntario de etanol sin alterar el consumo de sacarosa (Font y col., 2006b), lo que claramente sugiere que, parte de los efectos de la DP administrada sistémicamente sobre el consumo de alcohol podrían deberse al secuestro del ACD a nivel central. Los resultados del experimento 3A de la presente Memoria indican claramente que la

administración bilateral de DP 1.5 µg/h directamente en el VTA-p es capaz de reducir de forma significativa la aparición del fenómeno ADE. Como se aprecia en la Figura 5.27, los resultados del Experimento 3B confirman que la administración intracerebral de DP no produce, aparentemente, ninguna modificación del sabor, ya que el grupo tratado con DP en una región dorsal al VTA-p manifestó el fenómeno ADE de forma similar al grupo no tratado con DP. Es decir, la administración de DP en una zona fuera del VTA-p es incapaz de prevenir la manifestación del fenómeno ADE, lo cual permite descartar la posibilidad de que la alteración de la palatabilidad sea la única responsable de la ausencia de la aparición del ADE, es decir, de los efectos preventivos de la recaída de la DP. Por tanto, pensamos, al igual que Font y colaboradores, que los efectos preventivos del ADE observados tras la administración sistémica de la DP son, al menos en parte, específicos y debidos al secuestro del ACD.

Otro resultado destacable es que el secuestro localizado del ACD en el VTA-p es suficiente para prevenir la aparición del fenómeno ADE, poniendo en evidencia la importancia de éste área en el fenómeno de la recaída. Como se sabe, las neuronas DA ubicadas en VTA proyectan a diferentes zonas del cerebro, especialmente a NAc, y se activan tras la administración de drogas de abuso produciendo una mayor liberación de DA en los lugares de proyección (Fields y col., 2007). Se ha sugerido repetidamente que la activación de las neuronas DA de VTA es un fenómeno clave para desencadenar el llamado efecto “priming” impulsor de las recaídas en el consumo de drogas (De Wit H, 1996). El «efecto priming» es un incremento en la motivación para consumir una determinada droga que se produce cuando un paciente en abstinencia consume una única dosis (a veces muy pequeña, en relación a la que habitualmente consumía) de esa sustancia. Los pacientes abstinentes refieren con claridad que, si durante la abstinencia, consumen una pequeña dosis de su droga preferida, el deseo por volver a consumir e, incluso, la probabilidad de retomar el consumo regular, aumentan. Concretamente en alcohólicos, el primer episodio de ingesta

## *Discusión*

durante la abstinencia suele venir asociado con una pérdida de control, lo que suele acarrear una intoxicación severa y un retorno a un consumo regular de alcohol (Ludwig y col., 1974). Las descripciones subjetivas de este fenómeno por parte de los pacientes abstinentes han encontrado su reflejo, también, en la experimentación animal. De hecho, en los modelos animales habitualmente empleados hoy día para estudiar las bases mecanísticas del fenómeno de la recaída, la administración de una pequeña dosis de la droga en estudio es uno de los procedimientos más utilizados para desencadenarlo (Martin-Fardon y col., 2013). La activación de las neuronas DA del VTA-p parece ser un evento fundamental en este efecto “priming”, no sólo para el alcohol, sino también para otras drogas de abuso (De Vries y col., 1999; Self y col., 1998a; Shalev y col., 2002; Stewart y col., 1984; Stewart, 2000). **Los resultados de nuestro experimento sugieren que la eficacia preventiva de la recaída que muestra la DP en animales, viene mediada precisamente por su capacidad para evitar que, el ocasional consumo de alcohol en un animal abstinente, active las neuronas DA de VTA, y que esta activación ponga en marcha el proceso de la recaída.** Hemos de recordar en este punto, que datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación ya habían puesto de manifiesto, empleando otros paradigmas experimentales, la capacidad de la DP para evitar la activación de la neuronas DA de VTA-p tras la administración de etanol (Marti-Prats y col., 2010), por lo que creemos que las bases mecanísticas sugeridas aquí sobre el efecto preventivo de la recaída mostrado por la DP están bien sustentadas.

Cabe mencionar, sin embargo, que la ingesta total de líquidos se vio reducida de forma significativa en todos los grupos experimentales que constituyeron el experimento 3. Este hecho, podría, en principio, poner en entredicho la validez de nuestros resultados, ya que la reducción en el consumo de etanol podría atribuirse a un mal estado físico de los animales por una falta de recuperación del procedimiento quirúrgico. Sin embargo, el hecho de que los animales que recibieron vehículo (y que sufrieron la misma cirugía que los animales tratados con DP) mostrasen ADE y, además, de

magnitud comparable al obtenido en el ADE correspondiente al 4º periodo de abstinencia, en el cual los animales no estuvieron sujetos a cirugía, descarta esta posibilidad.

En conjunto, los resultados obtenidos en el Experimento 3 indican que **el VTA-p es una zona cerebral clave y altamente sensible a la acción bloqueante de la DP sobre el comportamiento de recaída en el alcoholismo** y, además, apoyan la idea de que la administración central de DP mediante el secuestro del ACD localmente producido en la propia VTA-p impide, a través del bloqueo del efecto “priming”, el desarrollo de la recaída.

### **6.3 Eficacia preventiva de la combinación de NTX/DP**

Diversos autores indican que, al menos en el caso del alcoholismo, es probable que no se pueda hallar una única molécula farmacológicamente activa que constituya por sí misma un tratamiento plenamente eficaz en todos los pacientes alcohólicos. Sugieren estos autores que, probablemente será una combinación de diferentes farmacoterapias junto con la intervención psicoterapéutica la que mejorará la eficacia de los actuales tratamientos (Spanagel y col., 2012).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el sistema opioide endógeno juega un papel crucial en los efectos que ejerce el etanol (o más bien el ACD o sus derivados) sobre el sistema mesocorticolímbico (SMCL) y consecuentemente sobre los fenómenos de refuerzo derivados del consumo de etanol (Herz, 1997; Koob y col., 1998). En este sentido un antagonista de los receptores opioides, la NTX, está actualmente aprobado para el tratamiento de la prevención de las recaídas en el alcoholismo. No obstante, los últimos estudios han mostrado que la NTX posee una eficacia preventiva moderada (Rosner y col., 2010b). Teóricamente, y de acuerdo con los conocimientos neurobiológicos actuales, si un individuo abstinerente reinicia,

## *Discusión*

aunque sea con dosis bajas, el consumo de alcohol, la presencia del antagonista opioide (en especial del subtipo  $\mu$ ), impediría la activación de las neuronas DA de VTA, evitando así que el efecto *priming* promueva la recaída. Sin embargo, el bloqueo continuado de los receptores  $\mu$  con esta finalidad, además de desencadenar la aparición de reacciones adversas en el paciente (cefaleas, trastornos del sueño, inquietud, náuseas, trastornos afectivos, diarreas, estreñimiento...(Agemed)) no puede considerarse una estrategia óptima para prevenir la activación de las neuronas DA de VTA tras una ingesta ocasional de alcohol. De hecho, algunos estudios preclínicos mostraban que el bloqueo continuado de los receptores opioides daba lugar a la aparición de lo que vinieron en llamar “delayed ADE” o ADE demorado. Heyser y colaboradores (2003) demostraron que la NTX era capaz de suprimir el ADE en un modelo de consumo voluntario muy similar al empleado en nuestra Memoria, tan sólo el primer día post-abstinencia, observando un incremento significativo en el consumo de etanol el segundo día post-abstinencia (“efecto rebote”). Spanagel y Holter (1999) por su parte, también en un modelo muy similar al nuestro, encontraron resultados similares tras la administración continuada de naloxona (1 mg/kg/h). En concreto, este antagonista de los MOR redujo el consumo de etanol el primer día post-abstinencia, observando el citado efecto rebote en el consumo de etanol el día 3 post-abstinencia. Estas evidencias experimentales basadas en modelos animales que miden la aparición del fenómeno ADE, parecen indicar que el uso continuado de antagonistas de los MORs puede no ser la mejor estrategia para evitar las recaídas en pacientes alcohólicos.

En el Experimento 5 de la presente Tesis Doctoral se pretendió evaluar la eficacia antirecaída de la combinación de DP y NTX. Los objetivos perseguidos con la realización de este experimento fueron varios. En primer lugar se pretendía comprobar si la combinación DP y NTX permitía mejorar los resultados obtenidos con antagonistas opioides en modelos preclínicos (Heyser y col., 2003; Holter y col., 1999). De ser satisfactorios los resultados de este experimento nos permitirían, además, corroborar indirectamente

nuestra hipótesis sobre el papel del ACD o sus derivados en la activación de las neuronas DA de VTA-p a través de los MORs (Sanchez-Catalan y col., 2009). Por último, intentábamos además averiguar si la combinación de ambos fármacos permite disminuir la dosis efectiva de DP lo que permitiría reducir la aparición de posibles efectos adversos asociados al uso de DP.

Tal y como podemos observar en la Figura 5.33, los animales tratados con NTX sólo, no cambiaron su ingesta de alcohol de forma significativa frente al consumo basal los días 1 y 2 post-abstinencia, suprimiendo así la aparición del fenómeno ADE. Sin embargo, tal y como esperábamos tras el análisis de los resultados de la bibliografía disponible, se observó un incremento significativo en el consumo de etanol los días 3 y 4 post-abstinencia (con un incremento del 149% y el 203%, respectivamente), en relación al consumo basal. Estos datos concuerdan claramente con los trabajos anteriormente comentados y confirman la aparición del ADE demorado (efecto rebote) (Heyser y col., 2003; Holter y col., 1999).

La combinación de la dosis ineficaz de DP (250 µg/h) junto con NTX fue, sin embargo, capaz de prevenir persistentemente la aparición del fenómeno ADE, y evitó el incremento en el consumo de etanol durante los 4 días post-abstinencia, es decir, esta combinación fue capaz de evitar el “rebote” observado con la administración crónica de NTX. Además, como se puede observar en la Figura 5.34, la tendencia al alza que se observa en la preferencia por el etanol en los animales tratados únicamente con NTX los días 3 y 4 post-abstinencia, fue completamente abolida con el uso de la combinación. Consecuentemente, podemos afirmar que **el tratamiento combinado de NTX/DP supone una mejora en comparación con cada uno de estos compuestos por separado: por un lado evita la aparición del “ADE demorado”, característico de los tratamientos con antagonistas opioides y, por otro, se obtienen resultados preventivos del ADE a una dosis de DP claramente inferior a la dosis eficaz según los datos de esta Memoria.**

## *Discusión*

¿Por qué el bloqueo continuado de los MORs puede ocasionar estos fenómenos “rebote”? y ¿por qué la combinación NTX/DP resulta más eficaz que los tratamientos por separado? Algunos autores sugieren que la administración repetida de antagonistas opioides conduce a largo plazo a una sobreexpresión del número total de receptores disponibles (Hyytia y col., 1999; Parkes y col., 2000; Sinclair, 2001). De esta forma, cuando estos receptores permanecen bloqueados durante un periodo prolongado de tiempo (en presencia de NTX o naloxona) el organismo, a través de un mecanismo homeostático, produce un incremento en el número de receptores como mecanismo de compensación. Este mayor nivel de receptores dejaría libres del bloqueo a algunos de ellos, de modo que tras el consumo ocasional de alcohol, el ACD generado o sus derivados podrían activarlos (Hipólito y col., 2012). La inclusión de DP en el tratamiento con antagonistas opioides, disminuiría la fracción de ACD disponible generada tras un consumo ocasional de etanol, reduciendo así la posibilidad de que el ACD o sus derivados actúen como agonistas de esos receptores sobreexpresados. En otras palabras, la DP “secuestraría” el ACD, limitando así las posibilidades de activación de los MOR incluso en un ambiente de sobreexpresión de los mismos.

En conclusión, **la terapia combinada NTX/DP demuestra una adecuada eficacia preclínica antirecaída**. Además, la combinación de estos dos compuestos con acciones complementarias (el bloqueo de los MORs por parte de la NTX y la inactivación del ACD por la DP), es capaz de bloquear el ADE demorado que suele aparecer tras la administración crónica de antagonistas opioides.

#### 6.4 Relación niveles plasmáticos/eficacia preventiva y parámetros farmacocinéticos básicos de la DP.

Los principales resultados obtenidos en este bloque de experimentos indican claramente que:

- Una **concentración en el plasma de DP de al menos  $2.8 \pm 0.47$   $\mu\text{g/ml}$**  de la rata **garantiza la eficacia antirecaída** del fármaco objeto de estudio. En esta situación, el nivel de DP en el cerebro del animal es aproximadamente de un 2-3% con respecto a su concentración plasmática.
  
- La **disposición la DP** en la rata Wistar presenta un comportamiento **NO LINEAL**, al menos en el ámbito de concentraciones plasmáticas ensayadas.
  
- La DP se elimina de un modo sustancialmente rápido del organismo, presentando un valor de **semivida de eliminación entorno a los 40 minutos**.
  
- El consumo prolongado de **alcohol reduce la eficiencia de los procesos de eliminación de la DP lo cual deriva en un aumento de sus concentraciones plasmáticas**.

#### **6.4.1 Relación niveles plasmáticos/eficacia preventiva del ADE.**

Una vez demostrada, en la primera parte de esta Memoria, la eficacia preclínica de la DP para la prevención de las recaídas en el consumo de alcohol, se inició un bloque de experimentos con el objetivo de caracterizar los parámetros cinéticos básicos de este fármaco. La obtención de estos datos es crucial a la hora de abordar el diseño, el desarrollo y la optimización de posibles formas farmacéuticas que permitan su administración en la futuras nuevas aplicaciones clínicas que se puedan proponer. No es un objetivo de esta memoria proponer una formulación definitiva con DP, ahora bien, el conocimiento de los parámetros farmacocinéticos y biofarmacéuticos básicos permitirá un hipotético abordaje tecnológico de garantías en un futuro próximo.

Antes que nada, para la realización de este tipo de ensayos es necesario contar con un método de valoración **sensible, exacto y preciso** con el fin de poder cuantificar el fármaco en las muestras biológicas recogidas. Por ello, esta es la primera cuestión que se debe resolver cuando se aborda un estudio de esta índole. Debido a la similitud estructural que presenta la DP con numerosos compuestos endógenos y/o sus propios metabolitos, su detección con métodos colorimétricos, mediante radioinmunoensayos o con cromatografía de gases no está aconsejada (Bergstrom y col., 1981). Por otro lado, la medida de la radiactividad de la molécula de <sup>14</sup>C-penicilamina, mediante un contador de centelleo en fase líquida, también se ha empleado en estudios farmacocinéticos previos desarrollados en animales (Patzschke y col., 1977; Planas-Bohne, 1972) o en el ser humano (Patzschke y col., 1977; Wei .P, and Sass-Kortsak .A., 1970). Es una técnica sensible y que no necesita un volumen elevado de muestra para su valoración, sin embargo, su mayor inconveniente radica en su falta de especificidad, lo cual la hace inapropiada para describir la farmacocinética de la DP inalterada. Es decir, la señal detectada podría corresponder a la molécula inalterada, a algún metabolito o a algún metabonato del que forme parte (disulfuro de

penicilamina, disulfuro de penicilamina cisteína o s-metilpenicilamina). Por todo ello, parece que la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es, en la actualidad, la opción más adecuada. En concreto, para la cuantificación de la DP en esta memoria se ha recurrido a un método de HPLC con detección electroquímica. Los ensayos de precisión y exactitud realizados muestran la validez del método empleado (Tabla 5.1).

Los resultados obtenidos en el Experimento 4 han permitido, prácticamente, **establecer la concentración mínima eficaz de la DP** en nuestras condiciones experimentales. Para poder alcanzar este objetivo se han tenido que cruzar los valores de concentración plasmática y en tejido cerebral del fármaco obtenidos en el Experimento 4 con los resultados de eficacia terapéutica determinados en el Experimento 1. Con el fin de poder establecer la citada relación niveles plasmático/eficacia se tuvieron que diseñar y realizar dos estudios independientes, desarrollados en momentos temporales distintos.

Como se puede apreciar a partir de los resultados del experimento 4, tras la infusión de **1000 µg/h de DP**, dosis que fue capaz de evitar la manifestación del *fenómeno ADE* en nuestras condiciones experimentales (Experimento 1), las concentraciones plasmáticas obtenidas fueron  $2.8 \pm 0.47$  µg/ml (Muestra M1) y  $4.3 \pm 0.37$  µg/ml (Muestra M2). Estos valores son claramente inferiores a los que se obtienen tras la administración intraperitoneal de 50 mg/kg de DP, considerada por Font y col. (2006) la dosis eficaz para lograr reducir el consumo voluntario de etanol. En concreto, los niveles plasmáticos obtenidos tras la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de DP (datos obtenidos en nuestro laboratorio en ensayos piloto no publicados) oscilaron entre 62 y 3.3 µg/ml a los 5 y 150 minutos, respectivamente. Esta divergencia en el valor de la dosis eficaz entre nuestros resultados y los propuestos por Font probablemente se deba a las diferentes variables de eficacia evaluadas. En nuestro caso, se ha determinado la dosis necesaria para prevenir la recaída empleando el

## Discusión

*modelo ADE*, sin embargo el grupo de Font y col. determinó la dosis eficaz para reducir el consumo voluntario de la droga. Aunque están relacionados entre sí, necesariamente no tienen por qué ser iguales.

En el mismo momento en el que se valoraron las muestras plasmáticas también se cuantificaron los niveles de DP alcanzados en dos regiones cerebrales diferenciadas (cerebro medio y cerebro anterior). Los niveles cerebrales siempre fueron aproximadamente del 2-3% de la concentración plasmática existente. Curiosamente, en ambos momentos experimentales (M1 y M2) los valores de DP cuantificados en el cerebro medio siempre han sido mayores que los registrados en el cerebro anterior (aunque no se detectaron diferencias significativas). Casualmente, estructuras cerebrales como el VTA y el NAc, las cuales juegan un papel crucial en el desarrollo de los efectos reforzantes de las drogas de abuso así como en la génesis de la recaída (Koob y col., 2006), se localizan en la citada región cerebral media.

Por otra parte, los niveles plasmáticos alcanzados tras la infusión de **250 µg/h de DP**, dosis no eficaz en nuestras condiciones experimentales, fueron de  $0.4 \pm 0.01$  µg/ml (Muestra M1) y  $0.6 \pm 0.14$  µg/ml (Muestra M2). En este caso, fue imposible cuantificar los niveles de DP en el tejido cerebral. Asumiendo que el porcentaje de DP en cerebro viene a ser el 2-3% del existente en plasma, es lógico que, con nuestro procedimiento de análisis, hayamos sido incapaces de detectar DP en las muestras cerebrales: de mantenerse esos porcentajes las concentraciones se encontrarían claramente por debajo del límite de detección del método analítico empleado.

Según nuestros resultados tanto en el momento de la reintroducción de las disoluciones de etanol (Muestra M1) como al final del periodo post-abstinencia monitorizado en nuestros estudios (Muestra M2), existen unos niveles de DP estables en el plasma y en el cerebro del animal. Estos resultados validan, al menos en parte, el diseño experimental utilizado. Es decir, (i) la administración a velocidad constante del fármaco en el territorio subcutáneo garantiza el acceso del fármaco al torrente circulatorio, (ii) el

fármaco es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar niveles adecuados en el cerebro del animal, (iii) el tiempo transcurrido desde la implantación de la bomba hasta la reexposición al alcohol es suficiente para alcanzar niveles estables del fármaco en los fluidos biológicos y (iv) se ha garantizado, experimentalmente, la existencia de niveles adecuados de DP a lo largo de todo el periodo post-abstinencia estudiado.

#### **6.4.2 Linealidad cinética y parámetros farmacocinéticos básicos de la DP en la rata.**

Con objeto de iniciar los estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos necesarios para obtener los datos fundamentales que permitan en un futuro proponer una nueva forma farmacéutica para esta nueva indicación de la DP, decidimos realizar un estudio básico sobre la disposición de este aminoácido azufrado que analizase su linealidad cinética dentro de un ámbito relativamente amplio de niveles plasmáticos y estableciese sus parámetros farmacocinéticos básicos. Además, puesto que los pacientes potenciales para esta nueva indicación serían sujetos con un largo historial de consumo de alcohol, el estudio de la linealidad farmacocinética de este fármaco se ha abordado en dos poblaciones de rata diferenciadas: en animales que nunca han estado expuestos al consumo de etanol (Estudio A) y en animales expuestos de manera crónica a la droga (Estudio B). Consideramos que este aspecto del diseño experimental es crucial para aproximarnos adecuadamente al potencial paciente que recibiría el tratamiento con DP. Estos estudios se han realizado tras la administración intravenosa rápida de tres dosis diferentes del fármaco (2, 10 ó 30 mg/kg), que dan lugar a un ámbito de concentraciones que incluye a los niveles plasmáticos eficaces de DP determinados en nuestro estudio anterior. Además este abanico de dosis también incluye la dosis empleada en humanos para otras indicaciones terapéuticas ya aprobadas para la DP (15 mg/kg/día en artritis reumatoide o intoxicación por metales pesados; 30 mg/kg/día en enfermedad de Wilson).

Es importante señalar que el estudio de la relación niveles plasmáticos/eficacia ya apuntaba la existencia, en el ámbito de velocidades de infusión estudiadas, de un comportamiento farmacocinético NO LINEAL para la DP, puesto que su concentración plasmática estacionaria aumentó más que proporcionalmente con el aumento en la velocidad de infusión. Dicho con otras palabras, la relación matemática entre las velocidades

ensayadas es de 4, mientras que la relación entre las concentraciones plasmáticas alcanzadas es de 6.6.

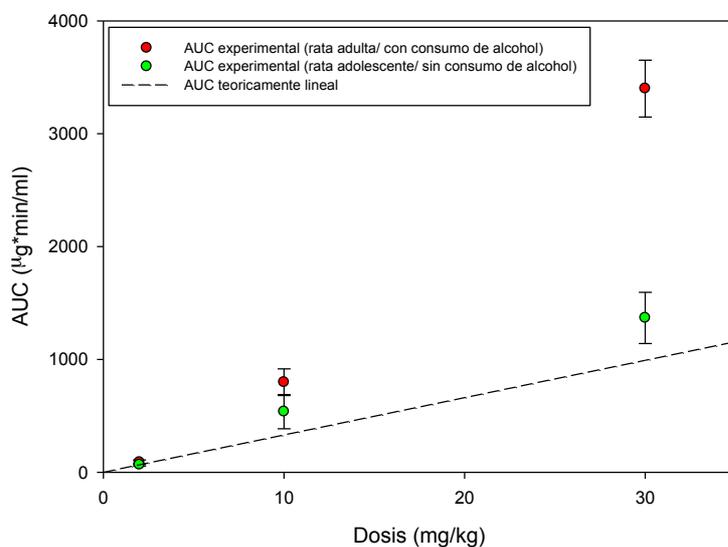
Los estudios realizados tras la administración de una dosis única en los distintos grupos de animales confirmaron este hecho. De acuerdo con los resultados obtenidos en el **Estudio A** (Tabla 5.9), existe una pérdida de linealidad cinética que se manifiesta de forma patente cuando se comparan los valores de los parámetros  $Cl_T$ ,  $t_{1/2}$ , y  $AUC_0^\infty^{(N)}$ , obtenidos con las tres dosis ensayadas. El análisis estadístico (ANOVA) realizado sobre los valores de área bajo la curva normalizados para la menor de las dosis ensayadas ( $AUC_0^\infty^{(N)}$ ), mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos; es decir, los valores de  $AUC_0^\infty$  aumentaron más que proporcionalmente con el incremento de la dosis administrada. Este crecimiento no lineal en los valores de  $AUC_0^\infty$  es fruto de los diferentes valores de  $Cl_T$  de la DP en función de la dosis ensayada. Así, el  $Cl_T$  ha oscilado entre  $10.84 \pm 1.84$  y  $6.31 \pm 1.01$  ml/min dependiendo de la dosis de DP administrada. El análisis estadístico confirmó, de nuevo, la existencia de diferencias significativas en el valor de este parámetro según la dosis administrada.

Paralelamente, tras la administración de las mismas dosis de DP en **animales adultos con un historial de consumo prolongado (Estudio B)**, una vez más, los resultados obtenidos evidencian la pérdida de linealidad en la disposición del fármaco con el aumento de la dosis administrada. El análisis estadístico realizado sobre los valores de área bajo la curva normalizados para la menor de las dosis ensayadas ( $AUC_0^\infty^{(N)}$ ) mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p < 10^{-4}$ ); es decir, nuevamente, los valores de  $AUC_0^\infty$  aumentaron más que proporcionalmente con el incremento de la dosis administrada. Además, este crecimiento no lineal en los valores de  $AUC_0^\infty$  vino acompañado de una reducción significativa del  $Cl_T$  del fármaco (Tabla 5.16). Así pues, el  $Cl_T$  ha variado desde los  $14.76 \pm 4.53$  ml/min (dosis 2 mg/kg), pasando por  $7.31 \pm 0.93$  ml/min (dosis 10 mg/kg) hasta los  $5.17 \pm 0.39$  obtenido tras la administración de 30 mg/kg de

## Discusión

DP. El análisis estadístico demostró, en una nueva ocasión, la existencia de diferencias significativas ( $P < 10^{-4}$ ) entre ellos.

La comparación de los valores de  $AUC_0^\infty$  obtenidos en los Estudios A y B evidencia, además, que la pérdida de linealidad cinética del fármaco es mucho más evidente dependiendo del tipo de población en la que se ensaya. En la siguiente figura se han representado los valores experimentales de  $AUC_0^\infty$  obtenidos en ambos estudios en función de la dosis administrada. Como se puede observar, los valores obtenidos en el Estudio B (rata adulta/consumo de alcohol) se alejan mucho más de la línea que teóricamente se debería haber obtenido si el  $AUC_0^\infty$  hubiera crecido linealmente



Por otro lado, cabe destacar que los cambios en la eliminación de la DP que se han manifestado en ambos estudios a través de variaciones en los valores del  $Cl_T$ , no se han visto acompañados de cambios en la pendiente terminal de las curvas de nivel plasmático, es decir, que la semivida de eliminación ha permanecido invariable. En ambos estudios, el análisis

estadístico no detectó variaciones significativas en el valor de la  $t_{1/2}$ . Este fenómeno podría explicarse recordando que el valor de la pendiente terminal de la curva de nivel plasmático (parámetro  $\beta$ , en nuestro caso) responde al cociente  $Cl_T$  / volumen de distribución del fármaco. Por tanto, una **variación del volumen de distribución** proporcional a los cambios manifestados en el  $Cl_T$  podría explicar, matemáticamente, el fenómeno observado. Teniendo en cuenta que en humanos se ha estimado que el porcentaje de DP libre en plasma (no unida a proteínas plasmáticas ni formando parte de metabonatos) es de alrededor de un 1% o menos (Abounassif y col., 1983; Perrett, 1981), la causa más posibilista de que el volumen de distribución de la DP varíe en función de la dosis administrada podría ser el cambio en el porcentaje de la fracción libre del fármaco en el plasma.

Por último, cabe destacar que a día de hoy no se conocen cuáles son las vías y/o mecanismos implicados en la eliminación de este fármaco. Sin embargo, llama poderosamente la atención los elevados valores de aclaramiento total ( $Cl_T$ ) hallados para la DP en la rata, los cuales claramente sobrepasan el flujo plasmático renal ( $5.89 \pm 1.73$  ml/min) en este animal (Granero y col., 1994) y se aproximan al valor de su flujo plasmático hepático, que según la bibliografía se sitúa en torno a 10 ml/min (Pierson y col., 1978). La determinación, en futuros experimentos, de la fracción de DP que aparece inalterada en la orina de la rata permitirá dirimir cual es el porcentaje de participación de la vía renal y de las otras vías implicadas en la eliminación del fármaco.

#### **6.4.3 Consumo crónico de alcohol y disposición de la DP.**

En el Estudio C, titulado Influencia del consumo prolongado de etanol en la disposición de la DP, se han comparado los parámetros farmacocinéticos de la DP obtenidos tras la administración de una dosis intermedia (10 mg/kg) en el denominado **grupo Control** (animales adultos que nunca han consumido etanol) con respecto a los obtenidos en el **grupo B-10** (animales adultos con un historial prolongado de consumo de la droga). La comparación estadística (ver Tabla 5.19) ha demostrado que el consumo prolongado de etanol ha conducido a un aumento del  $AUC_0^\infty$ , en concreto este parámetro mostró un incremento significativo ( $p=0.02$ ), pasando de  $492.48 \pm 70.11 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  en los animales que nunca han consumido etanol hasta  $798.12 \pm 117.53 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  en los animales alcohólicos. Lógicamente, esta variación en el valor del área bajo la curva viene causado por una reducción significativa ( $p=0.011$ ) del  $Cl_T$  del fármaco que pasó de  $11.0 \pm 2.6$  en los animales control hasta  $7.3 \pm 0.9 \text{ ml}/\text{min}$  en los animales con experiencia en el etanol. Por tanto, a la luz de los resultados obtenidos se puede decir que **el consumo prolongado de alcohol provoca una reducción del aclaramiento total de la DP en nuestras condiciones experimentales, que se sitúa en torno al 33% de su valor basal.**

#### 6.4.4 Edad y disposición de la DP.

La comparación realizada en el Estudio D (influencia de la edad del animal en la disposición de la DP) ha permitido demostrar que **el envejecimiento del animal no influye en la disposición de la DP**, al menos en nuestras condiciones experimentales. Los parámetros farmacocinéticos de la DP obtenidos tras la administración de 10 mg/kg del fármaco en el **grupo Control** (animales adultos que nunca habían consumido etanol) fueron comparados con los obtenidos en el **grupo A-10** (animales adolescentes que tampoco habían consumido la droga). Los valores de  $AUC_0^\infty$  obtenidos en ambos grupos no difirieron significativamente entre ellos, aunque el ANOVA sí detectó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el valor del  $Cl_T$  de la DP ( $p=0.002$ ). Este resultado es completamente lógico si se tiene en cuenta que la evolución desde rata adolescente hasta rata adulta conlleva casi la duplicación de su peso corporal, lo cual condicionará el valor de este parámetro. Por este motivo, siempre que se han tenido que comparar los valores de  $Cl_T$  obtenidos en animales con una masa corporal significativamente diferente, se ha recurrido a la normalización del mismo en función del peso corporal del animal. Esta normalización condujo a unos valores de  $Cl_T/kg$  de  $19.7 \pm 4.8$  y  $20.6 \pm 3.0$  ml/min/kg en ambos grupos experimentales, los cuales, ahora sí, no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Por último, y para concluir, se ha procedido a tabular y comparar los parámetros farmacocinéticos de la DP calculados para cada dosis administrada en nuestros estudios y en cada tipo de individuo empleado (joven sin experiencia en alcohol (Estudio A) o adulto con larga experiencia en alcohol (Estudio B)). Los resultados de esta comparación se resumen en la siguiente Tabla (Tabla 6.1)

## Discusión

	ESTUDIO A	ESTUDIO B	Significación	
AUC <sub>0</sub> <sup>∞</sup>	2 mg/kg	66.9±11.2	73.3±22.4	n.s.
	10 mg/kg	537.0±151.8	798.1±117.5	p=0.03
	30 mg/kg	1367.4±226.8	3400.0±251.5	p<10 <sup>-4</sup>
CL <sub>T</sub> /kg	2 mg/kg	30.2±6.3	23.8±4.3	n.s.
	10 mg/kg	19.8±4.8	12.9±1.8	p=0.008
	30 mg/kg	22.3±4.0	9.2±0.9	p<10 <sup>-4</sup>
t <sub>1/2</sub>	2 mg/kg	27.8±3.7	35.1±17.0	n.s.
	10 mg/kg	32.7±9.8	50.3±16.2	p=0.035
	30 mg/kg	32.9±6.6	43.9±6.4	p=0.015

**Tabla 6.1.** Resultados de la comparación estadística (T Student) realizada sobre los principales parámetros farmacocinéticos de la DP obtenidos tras la administración de 2, 10 ó 30 mg/kg del fármaco en los animales del estudio A (ratas adolescentes sin experiencia previa en el consumo de alcohol) y del estudio B (ratas adultas con un historial de consumo prolongado). El AUC<sub>0</sub><sup>∞</sup> se expresa en µg\*min/ml, el CL<sub>T</sub>/kg se expresa en ml/min/kg y la t<sub>1/2</sub> se expresa en minutos.

Como se puede observar, estos resultados **confirman que el consumo prolongado de alcohol conduce a cambios significativos en la disposición de la DP** que se manifiestan en: un incremento en el área total bajo la curva de niveles plasmáticos, una reducción de su aclaramiento total normalizado por kg de peso corporal y un aumento de la semivida de eliminación del mismo. Curiosamente, la influencia del consumo prolongado de alcohol se revela de forma más evidente a medida que aumenta la dosis administrada del fármaco (véase que para cualquiera de los parámetros

comparados, la significación estadística aumenta progresivamente a medida que se incrementa la dosis de DP). Así pues, por ejemplo, mientras que tras la administración de 2 mg/kg de DP no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ensayados, tras la administración de 30 mg/kg de DP todos los parámetros estudiados se vieron modificados significativamente.

Finalmente, es importante remarcar que los resultados alcanzados demuestran que este aminoácido se elimina rápidamente del organismo, presentando un valor de **semivida de eliminación en la rata que oscila entre los 30 y 40 minutos aproximadamente dependiendo de la dosis administrada**. Estos datos, obtenidos experimentalmente en nuestro laboratorio, confirman nuestras sospechas iniciales acerca de su rápida eliminación y refrendan que tanto el diseño experimental como especialmente la vía y el modo de administración de la DP utilizado para la realización de sus estudios farmacológicos han sido los adecuados. Por ello, el diseño de una nueva forma farmacéutica de liberación controlada (un implante subcutáneo, por ejemplo) debería ser considerado para estudios posteriores.



## 7 CONCLUSIONES



La presente Tesis Doctoral propone una nueva estrategia terapéutica para la prevención de las recaídas en el consumo de etanol basada en el uso de agentes secuestrantes del ACD, en concreto la DP, o bien su combinación con antagonistas opioides (NTX, uno de los tratamientos actualmente más utilizados). La eficacia de esta nueva estrategia se ha analizado a través de la medida del fenómeno ADE, utilizando un modelo preclínico con validez predictiva para la evaluación de nuevas moléculas útiles en la prevención de la recaída en el consumo de alcohol.

Las principales conclusiones obtenidas tras la realización del presente trabajo son:

- 1- La administración de DP por vía subcutánea en forma de infusión continua es capaz de suprimir de forma dosis-dependiente el fenómeno ADE en nuestro modelo animal, lo que sugiere una adecuada efectividad en la prevención de la recaída en ratas sometidas a un tratamiento de alcoholización crónico.
- 2- El VTA-p es un lugar clave en la acción preventiva de la DP: la administración directa de la DP en esta región cerebral impide la aparición del fenómeno ADE en nuestro modelo animal, sugiriendo que el secuestro del ACD producido en esta región tras el consumo de alcohol, puede ser clave para evitar el llamado “efecto priming” desencadenante de las recaídas.
- 3- La acción preventiva de la recaída ejercida por la DP parece ser, en parte, específica (dependiente del secuestro del ACD) e independiente de la alteración de la palatabilidad que este aminoácido provoca tras su administración sistémica, sobre todo a altas dosis.

## *Conclusiones*

- 4- La DP administrada por vía sistémica es capaz de suprimir el ADE cuando las concentraciones plasmáticas de este aminoácido son de alrededor de 3–4 µg/ml. En estas condiciones, los niveles cerebrales constituyen el 2-3% del nivel alcanzado en plasma.
  
- 5- La terapia combinada basada en la administración de DP y NTX es capaz de prevenir el ADE en nuestro modelo animal. Además, esta combinación evita la aparición del ADE demorado, la principal limitación de los tratamientos con antagonistas opioides en los modelos preclínicos de consumo voluntario.
  
- 6- La disposición de la DP tras su administración por vía intravenosa rápida es claramente no lineal en un ámbito de dosis que va desde 2 mg/kg hasta 30 mg/kg. El consumo continuado de alcohol conduce a una disminución en los valores de  $Cl_T$  de la DP. El aumento en la edad de los animales no parece, sin embargo, influir en los valores de este parámetro.
  
- 7- La semivida de la DP en la fase terminal de las curvas de niveles plasmáticos en la rata es muy baja (se sitúa en torno a los 40 minutos) e independiente de la dosis administrada, lo que aconsejaría, en principio, el diseño de formas farmacéuticas de liberación controlada para una hipotética nueva indicación destinada a la prevención de las recaídas.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

## *Bibliografía*

- Abounassif, M. A., & Jefferies, T. M. 1983. The determination of D-penicillamine and its disulphide in plasma by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1, 65-72.
- Addolorato, G., Leggio, L., Hopf, F. W., Diana, M., & Bonci, A. 2012. Novel therapeutic strategies for alcohol and drug addiction: Focus on GABA, ion channels and transcranial magnetic stimulation. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37, 163-177.
- Agemed. Ficha tecnica naltrexona accord. [www.agemed.es](http://www.agemed.es)
- Ahmed, S. H. 2005. Imbalance between drug and non-drug reward availability: A major risk factor for addiction. *European Journal of Pharmacology* 526, 9-20.
- Altshuler, H. L., Phillips, P. E., & Feinhandler, D. A. 1980. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. *Life Sciences* 26, 679-688.
- Andreollo, N. A., Santos, E. F., Araujo, M. R., & Lopes, L. R. 2012. Rat's age versus human's age: What is the relationship? *Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva : ABCD = Brazilian Archives of Digestive Surgery* 25, 49-51.
- Anton, R. F., Oroszi, G., O'Malley, S., Couper, D., Swift, R., Pettinati, H., & Goldman, D. 2008. An evaluation of mu-opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: Results from the combined pharmacotherapies and behavioral

## *Bibliografía*

- interventions for alcohol dependence (COMBINE) study. *Archives of General Psychiatry* 65, 135-144.
- Aragon, C. M., Abitbol, M., & Amit, Z. 1986. Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol. an examination using a conditioned taste-aversion paradigm. *Neuropharmacology* 25, 79-83.
- Aragon, C. M., Rogan, F., & Amit, Z. 1992. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochemical Pharmacology* 44, 93-98.
- Aravich, P. F., & Sclafani, A. 1980. Dietary preference behavior in rats fed bitter tasting quinine and sucrose octa acetate adulterated diets. *Physiology & Behavior* 25, 157-160.
- Arias, A., Feinn, R., & Kranzler, H. R. 2006. Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: A meta-analysis. *Drug and Alcohol Dependence* 83, 262-268.
- Arizzi-LaFrance, M. N., Correa, M., Aragon, C. M., & Salamone, J. D. 2006. Motor stimulant effects of ethanol injected into the substantia nigra pars reticulata: Importance of catalase-mediated metabolism and the role of acetaldehyde. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31, 997-1008.
- Bachteler, D., Economidou, D., Danysz, W., Ciccocioppo, R., & Spanagel, R. 2005. The effects of acamprosate and neramexane on cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior in rat. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30, 1104-1110.

- Badawy, A. A., & Evans, M. 1981. The mechanism of the antagonism by naloxone of acute alcohol intoxication. *British Journal of Pharmacology* 74, 514-516.
- Bart, G., Heilig, M., LaForge, K. S., Pollak, L., Leal, S. M., Ott, J., & Kreek, M. J. 2004. Substantial attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with heroin addiction in central sweden. *Molecular Psychiatry* 9, 547-549.
- Bart, G., Kreek, M. J., Ott, J., LaForge, K. S., Proudnikov, D., Pollak, L., & Heilig, M. 2005. Increased attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with alcohol dependence in central sweden. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30, 417-422.
- Becker, H. 2009. Alcohol dependence, withdrawal, and relapse. [Http://pubs.Niaaa.Nih.gov/publications/arh314/348-361.Htm](http://pubs.Niaaa.Nih.gov/publications/arh314/348-361.Htm)
- Berglund, M., Balldin, J., Bendtsen, P. *et al.* 1997. Pharmacological treatment of alcohol dependence. acamprosate and naltrexone offer new approach. *Lakartidningen* 94, 2645-2648.
- Bergmark, A. 2008. On treatment mechanisms--what can we learn from the COMBINE study? *Addiction (Abingdon, England)* 103, 703-705.
- Bergstrom, R. F., Kay, R. D., & Wagner, J. G. 1981. The pharmacokinetics of penicillamine in a female mongrel dog. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 9, 603-621.
- Bhagwat, S. V., Boyd, M. R., & Ravindranath, V. 1995. Brain mitochondrial cytochromes P450: Xenobiotic metabolism, presence of multiple forms

## *Bibliografía*

and their selective inducibility. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320, 73-83.

Bienkowski, P., Kostowski, W., & Koros, E. 1999a. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: Effects of naltrexone. *European Journal of Pharmacology* 374, 321-327.

Bienkowski, P., Kostowski, W., & Koros, E. 1999b. The role of drug-paired stimuli in extinction and reinstatement of ethanol-seeking behaviour in the rat. *European Journal of Pharmacology* 374, 315-319.

Bond, C., LaForge, K. S., Tian, M. *et al.* 1998. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: Possible implications for opiate addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9608-9613.

Boothby, L. A., & Doering, P. L. 2005. Acamprosate for the treatment of alcohol dependence. *Clinical Therapeutics* 27, 695-714.

Brown, Z. W., Amit, Z., & Smith, B. 1980. Intraventricular self-administration of acetaldehyde and voluntary consumption of ethanol in rats. *Behavioral and Neural Biology* 28, 150-155.

Brown, Z. W., Amit, Z., Smith, B., & Rockman, G. E. 1978. Differential effects on conditioned taste aversion learning with peripherally and centrally administered acetaldehyde. *Neuropharmacology* 17, 931-935.

Burish, T. G., Maisto, S. A., Cooper, A. M., & Sobell, M. B. 1981. Effects of voluntary short-term abstinence from alcohol on subsequent drinking patterns of college students. *Journal of Studies on Alcohol* 42, 1013-1020.

- Camarini, R., Nogueira Pires, M. L., & Calil, H. M. 2000. Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 3, 303-309.
- Cano-Cebrian, M. J., Zornoza-Sabina, T., Guerri, C., Polache, A., & Granero, L. 2003a. Acamprosate blocks the increase in dopamine extracellular levels in nucleus accumbens evoked by chemical stimulation of the ventral hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 368, 324-327.
- Cano-Cebrian, M. J., Zornoza-Sabina, T., Guerri, C., Polache, A., & Granero, L. 2003b. Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: An in vivo microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 367, 119-125.
- Conklin, C. A., & Tiffany, S. T. 2002. Cue-exposure treatment: Time for change. *Addiction* 97, 1219-1221.
- Correa, M., Arizzi, M. N., Betz, A., Mingote, S., & Salamone, J. D. 2003. Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Research Bulletin* 62, 197-202.
- Correa, M., Arizzi-Lafrance, M. N., & Salamone, J. D. 2009. Infusions of acetaldehyde into the arcuate nucleus of the hypothalamus induce motor activity in rats. *Life Sciences* 84, 321-327.
- Correa, M., Manrique, H. M., Font, L., Escrig, M. A., & Aragon, C. M. 2008. Reduction in the anxiolytic effects of ethanol by centrally formed

## *Bibliografía*

- acetaldehyde: The role of catalase inhibitors and acetaldehyde-sequestering agents. *Psychopharmacology* 200, 455-464.
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. 1999. Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: The role of brain catalase. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 23, 799-805.
- Correa, M., Pascual, M., Sanchis-Segura, C., Guerri, C., & Aragon, C. M. 2005. Lead-induced catalase activity differentially modulates behaviors induced by short-chain alcohols. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 82, 443-452.
- Correa, M., Salamone, J. D., Segovia, K. N., Pardo, M., Longoni, R., Spina, L., Peana, A. T., Vinci, S., & Acquas, E. 2012. Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36, 404-430.
- Correa, M., Sanchis-Segura, C., Pastor, R., & Aragon, C. M. 2004. Ethanol intake and motor sensitization: The role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiology & Behavior* 82, 231-240.
- D'Aquila, P. S., Newton, J., & Willner, P. 1997. Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiology & Behavior* 62, 421-426.
- De Vries, T. J., Schoffelmeer, A. N., Binnekade, R., & Vanderschuren, L. J. 1999. Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroin following long-term withdrawal of IV drug self-administration. *Psychopharmacology* 143, 254-260.

- De Wit H. 1996. Priming effects with drugs and other reinforcers. *Exp Clin Psychopharmacol.* 1996; 4:5-10
- Deehan, G. A., Jr, Brodie, M. S., & Rodd, Z. A. 2013. What is in that drink: The biological actions of ethanol, acetaldehyde, and salsolinol. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 13, 163-184.
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., & Piazza, P. V. 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305, 1014-1017.
- Dole, V. P. 1986. On the relevance of animal models to alcoholism in humans. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 10, 361-363.
- Edwards, S., Kenna, G. A., Swift, R. M., & Leggio, L. 2011. Current and promising pharmacotherapies, and novel research target areas in the treatment of alcohol dependence: A review. *Current Pharmaceutical Design* 17, 1323-1332.
- Enrico, P., Sirca, D., Mereu, M., Peana, A. T., Lintas, A., Golosio, A., & Diana, M. 2009. Acetaldehyde sequestering prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission. *Drug and Alcohol Dependence* 100, 265-271.
- Eriksson CJ, F. T. 1992. Human blood acetaldehyde. *Alcohol and Alcoholism* 1993, 2:9-25, 9.
- Escarabajal, D., Miquel, M., & Aragon, C. M. 2001. L-cysteine, a thiol amino acid, increases the stimulating acute effect of ethanol on locomotion. *Alcohol* 25, 83-88.
- Escarabajal, M. D., & Aragon, C. M. 2002. Concurrent administration of diethyldithiocarbamate and 4-methylpyrazole enhances ethanol-induced

## *Bibliografía*

- locomotor activity: The role of brain ALDH. *Psychopharmacology* 160, 339-343.
- European Medicine Agency (EMA). 2013. Resumen de EPAR para el publico general.
- European Medicine Agency (EMA). 2010. Guideline on the development of medicinal products for the treatment of alcohol dependence. [www.ma.europa.eu](http://www.ma.europa.eu).
- Fields, H. L., Hjelmstad, G. O., Margolis, E. B., & Nicola, S. M. 2007. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annual Review of Neuroscience* 30, 289-316.
- Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S., & Diana, M. 2004. Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29, 530-536.
- Font, L., Aragon, C. M., & Miquel, M. 2006a. Ethanol-induced conditioned place preference, but not aversion, is blocked by treatment with D - penicillamine, an inactivation agent for acetaldehyde. *Psychopharmacology* 184, 56-64.
- Font, L., Aragon, C. M., & Miquel, M. 2006b. Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behavioural Brain Research* 171, 78-86.
- Font, L., Miquel, M., & Aragon, C. M. 2005. Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: A sequestration agent for acetaldehyde. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 29, 1156-1164.

- Gianoulakis, C. 1996. Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: Human and basic science studies. *Alcohol and Alcoholism*. Supplement 1, 33-42.
- Gianoulakis, C., de Waele, J. P., & Thavundayil, J. 1996. Implication of the endogenous opioid system in excessive ethanol consumption. *Alcohol* 13, 19-23.
- Giselle V. Kamenetzky, Alba E. Mustaca. 2005. Modelos animales para el estudio del alcoholismo. *Terapia Psicológica* 001 , 65-72.
- Granero, L., Gimeno, M. J., Torres-Molina, F., Chesa-Jimenez, J., & Peris, J. E. 1994. Studies on the renal excretion mechanisms of cefadroxil. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 22, 447-450.
- Gual, A., He, Y., Torup, L., van den Brink, W., Mann, K., & for the ESENSE 2 Study Group. 2013. A randomised, double-blind, placebo-controlled, efficacy study of nalmefene, as-needed use, in patients with alcohol dependence. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. [Epub ahead of print].
- Hall, F. S., Sora, I., & Uhl, G. R. 2001. Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology* 154, 43-49.
- Heilig, M., Goldman, D., Berrettini, W., & O'Brien, C. P. 2011. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 670-684.
- Herz, A. 1997. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology* 129, 99-111.

## *Bibliografía*

- Heyser, C. J., Moc, K., & Koob, G. F. 2003. Effects of naltrexone alone and in combination with acamprosate on the alcohol deprivation effect in rats. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28, 1463-1471.
- Heyser, C. J., Schulteis, G., Durbin, P., & Koob, G. F. 1998. Chronic acamprosate eliminates the alcohol deprivation effect while having limited effects on baseline responding for ethanol in rats. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 18, 125-133.
- Hipolito, L., Sanchez-Catalan, M. J., Polache, A., & Granero, L. 2007. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: An update. *Current Drug Metabolism* 8, 716-727.
- Hipolito, L., Sanchez, M. J., Polache, A., & Granero, L. 2009. Induction of brain CYP2E1 changes the effects of ethanol on dopamine release in nucleus accumbens shell. *Drug and Alcohol Dependence* 100, 183–90.
- Hipolito, L., Sanchez-Catalan, M. J., Marti-Prats, L., Granero, L., & Polache, A. 2012. Revisiting the controversial role of salsolinol in the neurobiological effects of ethanol: Old and new vistas. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36, 362-378.
- Hirayama, C., Kishimoto, Y., Wakushima, T., & Murawaki, Y. 1983. Mechanism of the protective action of thiol compounds in ethanol-induced liver injury. *Biochemical Pharmacology* 32, 321-325.
- Holter, S. M., Henniger, M. S., Lipkowski, A. W., & Spanagel, R. 2000. Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology* 153, 93-102.

- Holter, S. M., & Spanagel, R. 1999. Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology* 145, 360-369.
- Hyytia, P., Ingman, K., Soini, S. L., Laitinen, J. T., & Korpi, E. R. 1999. Effects of continuous opioid receptor blockade on alcohol intake and up-regulation of opioid receptor subtype signalling in a genetic model of high alcohol drinking. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 360, 391-401.
- Ikemoto, S. 2010. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35, 129-150.
- Ikemoto, S. 2007. Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews* 56, 27-78.
- Jacobsen, E. 1952. The metabolism of ethyl alcohol. *Pharmacological Reviews* 4, 107-135.
- Johnson, S. W., & North, R. A. 1992. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *The Journal of Physiology* 450, 455-468.
- Joyce, D. A., Day, R. O., & Murphy, B. R. 1991. The pharmacokinetics of albumin conjugates of D-penicillamine in humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 19, 309-311.
- Jupp, B., & Lawrence, A. J. 2010. New horizons for therapeutics in drug and alcohol abuse. *Pharmacology & Therapeutics* 125, 138-168.

## *Bibliografía*

- Katner, S. N., Magalong, J. G., & Weiss, F. 1999. Reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 20, 471-479.
- Kera, Y., Kiriya, T., & Komura, S. 1985. Conjugation of acetaldehyde with cysteinylglycine, the first metabolite in glutathione breakdown by gamma-glutamyltranspeptidase. *Agents and Actions* 17, 48-52.
- Kiianmaa, K., Hoffman, P. L., & Tabakoff, B. 1983. Antagonism of the behavioral effects of ethanol by naltrexone in BALB/c, C57BL/6, and DBA/2 mice. *Psychopharmacology* 79, 291-294.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. 2006. *Neurobiology of addiction*. Elsevier,
- Koob, G. F., Roberts, A. J., Schulteis, G., Parsons, L. H., Heyser, C. J., Hyttia, P., Merlo-Pich, E., & Weiss, F. 1998. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 22, 3-9.
- Kornet, M., Goosen, C., Van Ree, J.N. 1991. Effect of naltrexone on alcohol consumption during chronic alcohol drinking and after a period of imposed abstinence in free-choice drinking rhesus monkeys. *Psychopharmacology*, 104(3):367-76.
- Kranzler, H. R., & Van Kirk, J. 2001. Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: A meta-analysis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 25, 1335-1341.
- Kreuzig, F., & Frank, J. 1981. Rapid automated determination of D-penicillamine in plasma and urine by ion-exchange high-performance

- liquid chromatography with electrochemical detection using a gold electrode. *Journal of Chromatography* 218, 615-620.
- Kroslak, T., Laforge, K. S., Gianotti, R. J., Ho, A., Nielsen, D. A., & Kreek, M. J. 2007. The single nucleotide polymorphism A118G alters functional properties of the human mu opioid receptor. *Journal of Neurochemistry* 103, 77-87.
- Kukovetz, W. R., Beubler, E., Kreuzig, F., Moritz, A. J., Nirnberger, G., & Werner-Breitenecker, L. 1983. Bioavailability and pharmacokinetics of D-penicillamine. *The Journal of Rheumatology* 10, 90-94.
- Larimer, M. E., Palmer, R. S., & Marlatt, G. A. 1999. Relapse prevention. an overview of marlatt's cognitive-behavioral model. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 23, 151-160.
- Le Magnen J. 1960. Etude de quelques facteurs associé à des modification de la consommation spontanée d'alcool éthylique par le rat. *J Physiol* 52: 873–884
- Le, A., & Shaham, Y. 2002a. Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacology & Therapeutics* 94, 137-156.
- Le, A., & Shaham, Y. 2002b. Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacology & Therapeutics* 94, 137-156.
- Le, A. D., Poulos, C. X., Harding, S., Watchus, J., Juzytsch, W., & Shaham, Y. 1999. Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology*

## *Bibliografía*

- : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology 21, 435-444.
- Leggio, L., Cardone, S., Ferrulli, A., Kenna, G. A., Diana, M., Swift, R. M., & Addolorato, G. 2010. Turning the clock ahead: Potential preclinical and clinical neuropharmacological targets for alcohol dependence. *Current Pharmaceutical Design* 16, 2159-2118.
- Litten, R. Z., Egli, M., Heilig, M., Cui, C., Fertig, J. B., Ryan, M. L., Falk, D. E., Moss, H., Huebner, R., & Noronha, A. 2012. Medications development to treat alcohol dependence: A vision for the next decade. *Addiction Biology* 17, 513-527.
- Littleton, J. M. 2007. Acamprosate in alcohol dependence: Implications of a unique mechanism of action. *Journal of Addiction Medicine* 1, 115-125.
- Liu, X., & Weiss, F. 2002. Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: Exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 7856-7861.
- Ludwig, A. M., & Wikler, A. 1974. "Craving" and relapse to drink. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol* 35, 108-130.
- Luquiens, A., Reynaud, M., & Aubin, H. J. 2011. Is controlled drinking an acceptable goal in the treatment of alcohol dependence? A survey of french alcohol specialists. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 46, 586-591.
- Mann, K., Bladstrom, A., Torup, L., Gual, A., & van den Brink, W. 2013. Extending the treatment options in alcohol dependence: A randomized

- controlled study of as-needed nalmefene. *Biological Psychiatry* 73, 706-713.
- Manrique, H. M., Miquel, M., & Aragon, C. M. 2006. Acute administration of 3-nitropropionic acid, a reactive oxygen species generator, boosts ethanol-induced locomotor stimulation. new support for the role of brain catalase in the behavioural effects of ethanol. *Neuropharmacology* 51, 1137-1145.
- Martin-Fardon, R., & Weiss, F. 2013. Modeling relapse in animals. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 13, 403-432.
- Marti-Prats, L., Sanchez-Catalan, M. J., Hipolito, L., Orrico, A., Zornoza, T., Polache, A., & Granero, L. 2010. Systemic administration of D-penicillamine prevents the locomotor activation after intra-VTA ethanol administration in rats. *Neuroscience Letters* 483, 143-147.
- Marti-Prats, L., Sanchez-Catalan, M. J., Orrico, A., Zornoza, T., Polache, A., & Granero, L. 2013. Opposite motor responses elicited by ethanol in the posterior VTA: The role of acetaldehyde and the non-metabolized fraction of ethanol. *Neuropharmacology* 72C, 204-214.
- Matsuzawa, S., Suzuki, T., & Misawa, M. 2000. Involvement of mu-opioid receptor in the salsolinol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 24, 366-372.
- McGeehan, A. J., & Olive, M. F. 2003. The anti-relapse compound acamprosate inhibits the development of a conditioned place preference to ethanol and cocaine but not morphine. *British Journal of Pharmacology* 138, 9-12.

## *Bibliografía*

- McKinzie, D. L., Li, T. K., McBride, W. J., & Slusher, B. S. 2000. NAALADase inhibition reduces alcohol consumption in the alcohol-preferring (P) line of rats. *Addiction Biology* 5, 411-416.
- McLellan, A. T., Lewis, D. C., O'Brien, C. P., & Kleber, H. D. 2000. Drug dependence, a chronic medical illness: Implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 284, 1689-1695.
- Melis, M., Enrico, P., Peana, A. T., & Diana, M. 2007. Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *The European Journal of Neuroscience* 26, 2824-2833.
- Middaugh, L. D., & Bandy, A. L. 2000. Naltrexone effects on ethanol consumption and response to ethanol conditioned cues in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology* 151, 321-327.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2013. Drogas en población general en España. informe EDADES 2011-2012.
- Myers, W. D., Ng, K. T., & Singer, G. 1982. Intravenous self-administration of acetaldehyde in the rat as a function of schedule, food deprivation and photoperiod. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 17, 807-811.
- Nagasawa, H. T., Elberling, J. A., & DeMaster, E. G. 1980. Structural requirements for the sequestration of metabolically generated acetaldehyde. *Journal of Medicinal Chemistry* 23, 140-143.
- Nagasawa, H. T., Goon, D. J., Muldoon, W. P., & Zera, R. T. 1984. 2-substituted thiazolidine-4(R)-carboxylic acids as prodrugs of L-cysteine. protection of mice against acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* 27, 591-596.

- Netter, P., Bannwarth, B., Pere, P., & Nicolas, A. 1987. Clinical pharmacokinetics of D-penicillamine. *Clinical Pharmacokinetics* 13, 317-333.
- O'Malley, S. S., Jaffe, A. J., Chang, G., Schottenfeld, R. S., Meyer, R. E., & Rounsaville, B. 1992. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Archives of General Psychiatry* 49, 881-887.
- Oslin, D. W., Berrettini, W., Kranzler, H. R., Pettinati, H., Gelernter, J., Volpicelli, J. R., & O'Brien, C. P. 2003. A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28, 1546-1552.
- Parkes, H., & Sinclair, J. D. 2000. Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. *Alcohol* 21, 215-221.
- Pastor, R., & Aragon, C. M. 2008. Ethanol injected into the hypothalamic arcuate nucleus induces behavioral stimulation in rats: An effect prevented by catalase inhibition and naltrexone. *Behavioural Pharmacology* 19, 698-705.
- Pastor, R., & Aragon, C. M. 2006. The role of opioid receptor subtypes in the development of behavioral sensitization to ethanol. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31, 1489-1499.
- Pastor, R., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. 2005. Effect of selective antagonism of mu(1)-, mu(1/2)-, mu(3)-, and delta-opioid receptors on

## *Bibliografía*

- the locomotor-stimulating actions of ethanol. *Drug and Alcohol Dependence* 78, 289-295.
- Pastor, R., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. 2002. Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rate of production. *Psychopharmacology* 165, 51-59.
- Patzschke, K., Wegner, L., Kaller, H., & Horster, F. A. 1977. Pharmacokinetic studies after oral application of radioactively labelled D-penicillamine. *Zeitschrift Fur Rheumatologie* 36, 96-105.
- Paxinos G. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. sixth
- Peana, A. T., Assaretti, A. R., Muggironi, G., Enrico, P., & Diana, M. 2009. Reduction of ethanol-derived acetaldehyde induced motivational properties by L-cysteine. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 33, 43-48.
- Peana, A. T., Enrico, P., Assaretti, A. R., Pulighe, E., Muggironi, G., Nieddu, M., Piga, A., Lintas, A., & Diana, M. 2008. Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: A conditioned place preference study in the rat. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 32, 249-258.
- Peana, A. T., Giugliano, V., Rosas, M., Sabariego, M., & Acquas, E. 2012. Effects of l-cysteine on reinstatement of ethanol-seeking behavior and on reinstatement-elicited extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the rat nucleus accumbens shell. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*
- Peana, A. T., Muggironi, G., Calvisi, G., Enrico, P., Mereu, M., Nieddu, M., Boatto, G., & Diana, M. 2010. l-cysteine reduces oral ethanol self-

- administration and reinstatement of ethanol-drinking behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 94, 431-437.
- Perreau-Lenz, S., Vengeliene, V., Noori, H. R., Merlo-Pich, E. V., Corsi, M. A., Corti, C., & Spanagel, R. 2012. Inhibition of the casein-kinase-1-epsilon/delta/ prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37, 2121-2131.
- Perrett, D. 1981. The metabolism and pharmacology of D-penicillamine in man. *The Journal of Rheumatology*. Supplement 7, 41-50.
- Pierson, R. N., Jr, Price, D. C., Wang, J., & Jain, R. K. 1978. Extracellular water measurements: Organ tracer kinetics of bromide and sucrose in rats and man. *The American Journal of Physiology* 235, F254-64.
- Planas-Bohne, F. 1972. Pharmacokinetic studies on 14 C-labelled penicillamine. *Arzneimittel-Forschung* 22, 1426-1433.
- Quertemont, E., & De Witte, P. 2001. Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 68, 449-454.
- Quintanilla, M. E., Callejas, O., & Tampier, L. 2002. Aversion to acetaldehyde: Differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol* 26, 69-74.
- Rainer Spanagel and Carles Sanchis-Segura. 2003. The use of transgenic mice to study addictive behavior. *Clinical Neuroscience Research* Volume 3, Issues 4-5, , Pages 325-331.
- Raskin NH, S. L. 1970. Alcohol deshydrogenase activity in rat brain and liver. *Journal of Neurochemistry* 17, 1677-1687.

## *Bibliografía*

- Ray, L. A., & Hutchison, K. E. 2007. Effects of naltrexone on alcohol sensitivity and genetic moderators of medication response: A double-blind placebo-controlled study. *Archives of General Psychiatry* 64, 1069-1077.
- Rehm, J., Zatonksi, W., Taylor, B., & Anderson, P. 2011. Epidemiology and alcohol policy in europe. *Addiction* 106 Suppl 1, 11-19.
- Richter, C. P., & Campbell, K. H. 1940. Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science* 91, 507-508.
- Rodd, Z. A., Bell, R. L., Sable, H. J., Murphy, J. M., & McBride, W. J. 2004. Recent advances in animal models of alcohol craving and relapse. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 79, 439-450.
- Rodd-Henricks, Z. A., McKinzie, D. L., Shaikh, S. R., Murphy, J. M., McBride, W. J., Lumeng, L., & Li, T. K. 2000. Alcohol deprivation effect is prolonged in the alcohol preferring (P) rat after repeated deprivations. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 24, 8-16.
- Rodd-Henricks, Z. A., Melendez, R. I., Zaffaroni, A., Goldstein, A., McBride, W. J., & Li, T. K. 2002. The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 72, 55-64.
- Roozen, H. G., de Waart, R., van der Windt, D. A., van den Brink, W., de Jong, C. A., & Kerkhof, A. J. 2006. A systematic review of the effectiveness of naltrexone in the maintenance treatment of opioid and alcohol dependence. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 16, 311-323.

- Rosner, S., Hackl-Herrwerth, A., Leucht, S., Lehert, P., Vecchi, S., & Soyka, M. 2010a. Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* (9):CD004332. doi, CD004332.
- Rosner, S., Hackl-Herrwerth, A., Leucht, S., Vecchi, S., Srisurapanont, M., & Soyka, M. 2010b. Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* (12):CD001867. doi, CD001867.
- Salaspuro, V. J., Hietala, J. M., Marvola, M. L., & Salaspuro, M. P. 2006. Eliminating carcinogenic acetaldehyde by cysteine from saliva during smoking. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15, 146-149.
- Salimov, R. M., & Salimova, N. B. 1993. The alcohol-deprivation effect in hybrid mice. *Drug and Alcohol Dependence* 32, 187-191.
- Samson, H. H., & Doyle, T. F. 1985. Oral ethanol self-administration in the rat: Effect of naloxone. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 22, 91-99.
- Samson, H. H., Sharpe, A. L., & Denning, C. 1999. Initiation of ethanol self-administration in the rat using sucrose substitution in a sipper-tube procedure. *Psychopharmacology* 147, 274-279.
- Sanchez-Catalan, M. J. 2011. Efectos neuroconductuales del etanol: Papel del acetaldehído y de los receptores opioides. estudios en el área tegmental ventral de la rata. Tesis Doctoral.
- Sanchez-Catalan, M. J., Hipolito, L., Guerri, C., Granero, L., & Polache, A. 2008. Distribution and differential induction of CYP2E1 by ethanol and

## *Bibliografía*

- acetone in the mesocorticolimbic system of rat. *Alcohol and Alcoholism* (Oxford, Oxfordshire) 43, 401-407.
- Sanchez-Catalan, M. J., Hipolito, L., Zornoza, T., Polache, A., & Granero, L. 2009. Motor stimulant effects of ethanol and acetaldehyde injected into the posterior ventral tegmental area of rats: Role of opioid receptors. *Psychopharmacology* 204, 641-653.
- Sanchis-Segura, C., Correa, M., & Aragon, C. M. 2000. Lesion on the hypothalamic arcuate nucleus by estradiol valerate results in a blockade of ethanol-induced locomotion. *Behavioural Brain Research* 114, 57-63.
- Sanchis-Segura, C., Grisel, J. E., Olive, M. F., Ghazizadeh, S., Koob, G. F., Roberts, A. J., & Cowen, M. S. 2005. Role of the endogenous opioid system on the neuropsychopharmacological effects of ethanol: New insights about an old question. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 29, 1522-1527.
- Sanchis-Segura, C., Miquel, M., Correa, M., & Aragon, C. M. 1999. Daily injections of cyanamide enhance both ethanol-induced locomotion and brain catalase activity. *Behavioural Pharmacology* 10, 459-465.
- Sanchis-Segura, C., Pastor, R., & Aragon, C. M. 2004. Opposite effects of acute versus chronic naltrexone administration on ethanol-induced locomotion. *Behavioural Brain Research* 153, 61-67.
- Sanchis-Segura, C., & Spanagel, R. 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview. *Addiction Biology* 11, 2-38.
- Saunders B.D., Trapp R.G. *Basic and clinical bioestatistics*. (1994). 2ª ed.

- Self, D. W., & Nestler, E. J. 1998a. Relapse to drug-seeking: Neural and molecular mechanisms. *Drug and Alcohol Dependence* 51, 49-60.
- Self, D. W., & Nestler, E. J. 1998b. Relapse to drug-seeking: Neural and molecular mechanisms. *Drug and Alcohol Dependence* 51, 49-60.
- Serrano, E., Pozo, O. J., Beltran, J., Hernandez, F., Font, L., Miquel, M., & Aragon, C. M. 2007. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4S,2RS)-2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a stable adduct formed between D-(-)-penicillamine and acetaldehyde (main biological metabolite of ethanol), in plasma, liver and brain rat tissues. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM* 21, 1221-1229.
- Shaham, Y., Erb, S., & Stewart, J. 2000. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: A review. *Brain Research Reviews* 33, 13-33.
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., & Stewart, J. 2003. The reinstatement model of drug relapse: History, methodology and major findings. *Psychopharmacology* 168, 3-20.
- Shalev, U., Grimm, J. W., & Shaham, Y. 2002. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: A review. *Pharmacological Reviews* 54, 1-42.
- Shen, X. Y., Orson, F. M., & Kosten, T. R. 2012. Vaccines against drug abuse. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 91, 60-70.
- Sinclair, J.D.& R.J. Senter, 1967, Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation, *Psychonom.Sci.* 8, 11.

## *Bibliografía*

- Sinclair, J. D. 2001. Evidence about the use of naltrexone and for different ways of using it in the treatment of alcoholism. *Alcohol and Alcoholism* 36, 2-10.
- Sinclair, J. D., & Li, T. K. 1989. Long and short alcohol deprivation: Effects on AA and P alcohol-preferring rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 6, 505-509.
- Sinclair, J. D., & Senter, R. J. 1968. Development of an alcohol-deprivation effect in rats. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol* 29, 863-867.
- Sinclair, J. D., & Sheaff, B. 1973a. A negative alcohol-deprivation effect in hamsters. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol* 34, 71-77.
- Sinclair, J. D., & Sheaff, B. 1973b. A negative alcohol-deprivation effect in hamsters. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol* 34, 71-77.
- Sirca, D., Enrico, P., Mereu, M., Peana, A. T., & Diana, M. 2011. L-cysteine prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 35, 862-869.
- Skolnick, P., & Volkow, N. D. 2012. Addiction therapeutics: Obstacles and opportunities. *Biological Psychiatry* 72, 890-891.
- Smith, B. R., Amit, Z., & Splawinsky, J. 1984. Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol* 1, 193-195.
- Soyka, M., & Rosner, S. 2008. Opioid antagonists for pharmacological treatment of alcohol dependence - a critical review. *Current Drug Abuse Reviews* 1, 280-291.

- Spanagel, R. 2009. Alcoholism: A systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological Reviews* 89, 649-705.
- Spanagel, R. 2003. Alcohol addiction research: From animal models to clinics. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 17, 507-518.
- Spanagel, R. 2000. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 24, 124-131.
- Spanagel, R., & Heilig, M. 2005. Addiction and its brain science. *Addiction* 100, 1813-1822.
- Spanagel, R., & Holter, S. M. 2000. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *Journal of Neural Transmission* 107, 669-680.
- Spanagel, R., & Holter, S. M. 1999. Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: An animal model of alcoholism? *Alcohol and Alcoholism* 34, 231-243.
- Spanagel, R., Holter, S. M., Allingham, K., Landgraf, R., & Zieglgansberger, W. 1996. Acamprosate and alcohol: I. effects on alcohol intake following alcohol deprivation in the rat. *European Journal of Pharmacology* 305, 39-44.
- Spanagel, R., & Kiefer, F. 2008. Drugs for relapse prevention of alcoholism: Ten years of progress. *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 109-115.
- Spanagel, R., & Vengeliene, V. 2012. New pharmacological treatment strategies for relapse prevention. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*

## *Bibliografía*

- Srisurapanont, M., & Jarusuraisin, N. 2005a. Naltrexone for the treatment of alcoholism: A meta-analysis of randomized controlled trials. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 8, 267-280.
- Srisurapanont, M., & Jarusuraisin, N. 2005b. Opioid antagonists for alcohol dependence. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (1), CD001867.
- Srisurapanont, M., & Jarusuraisin, N. 2002. Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* (2), CD001867.
- Stewart, J. 2000. Pathways to relapse: The neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN* 25, 125-136.
- Stewart, J., de Wit, H., & Eikelboom, R. 1984. Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiates and stimulants. *Psychological Review* 91, 251-268.
- Tabakoff B, Anderson RA, Ritzmann RF. 1976. Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochemical Pharmacology* 25, 1305-1309.
- Tampier, L., & Mardones, J. 1987. Absence of effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on blood ethanol levels after oral administration, in rats. *Alcohol* 4, 73-74.
- Tampier, L., & Mardones, J. 1986. Effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on ethanol blood levels after intraperitoneal administration. *Alcohol* 3, 181-183.

- Torres-Molina, F., Peris, J. E., Garcia-Carbonell, M. C., Aristorena, J. C., Granero, L., & Chesa-Jimenez, J. 1996. Use of rats chronically cannulated in the jugular vein and the duodenum in pharmacokinetic studies. effect of ether anesthesia on absorption of amoxicillin. *Arzneimittel-Forschung* 46, 716-719.
- UNODC (United Nation Office on Drug and Crime, World Drug Report, 2012). 2012. World drug report 2012.(United Nations publication, Sales No. E.12.XI.1)
- Vanderschuren, L. J., & Everitt, B. J. 2005. Behavioral and neural mechanisms of compulsive drug seeking. *European Journal of Pharmacology* 526, 77-88.
- Vanderschuren, L. J., & Everitt, B. J. 2004. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* 305, 1017-1019.
- Vengeliene, V., Bachteler, D., Danysz, W., & Spanagel, R. 2005. The role of the NMDA receptor in alcohol relapse: A pharmacological mapping study using the alcohol deprivation effect. *Neuropharmacology* 48, 822-829.
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., & Spanagel, R. 2008. Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology* 154, 299-315.
- Vengeliene, V., Heidbreder, C. A., & Spanagel, R. 2007. The effects of lamotrigine on alcohol seeking and relapse. *Neuropharmacology* 53, 951-957.
- Vengeliene, V., Leonardi-Essmann, F., Perreau-Lenz, S., Gebicke-Haerter, P., Drescher, K., Gross, G., & Spanagel, R. 2006. The dopamine D3

## *Bibliografía*

- receptor plays an essential role in alcohol-seeking and relapse. The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 20, 2223-2233.
- Volpicelli, J. R., Alterman, A. I., Hayashida, M., & O'Brien, C. P. 1992. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. Archives of General Psychiatry 49, 876-880.
- Wagner J.G. 1993. Pharmacokinetics for the pharmaceutical scientist. Technomic Publishing Co.
- Walker, B. M., & Koob, G. F. 2008. Pharmacological evidence for a motivational role of kappa-opioid systems in ethanol dependence. Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33, 643-652.
- Wei .P, and Sass-Kortsak .A. 1970. Urinary excretion and renal clearances of D-penicillamine in humans and the dog. Gastroenterology 58: 288
- Wiesner, R. H., Dickson, E. R., Carlson, G. L., McPhaul, L. W., & Go, V. L. 1981. The pharmacokinetics of D-penicillamine in man. The Journal of Rheumatology. Supplement 7, 51-55.
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J. *et al.* 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in europe 2010. European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology 21, 655-679.
- Wolffgramm, J., & Heyne, A. 1991. Social behavior, dominance, and social deprivation of rats determine drug choice. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior 38, 389-399.
- World Health Organization. 2011. Global status on alcohol and health.

## *Bibliografía*

- Xiao, C., Zhang, J., Krnjevic, K., & Ye, J. H. 2007. Effects of ethanol on midbrain neurons: Role of opioid receptors. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 31, 1106-1113.
- Zhang, Y., Wang, D., Johnson, A. D., Papp, A. C., & Sadee, W. 2005. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 32618-32624.
- Zimatkin, S. M., Pronko, S. P., Vasiliou, V., Gonzalez, F. J., & Deitrich, R. A. 2006. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 30, 1500-1505.







