



UNIVERSIDAD DE VALENCIA FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, a esta Tesis doctoral de D. MARIA JOSE CANO CEBRIAN la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE.
Valencia, a 7 de Julio de 2008.

El Secretario,

El Presidente,

Neurolé



TD-FARM

257

121068525



Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

**Aportaciones al Estudio de la
Farmacología del Acamprosato**

Memoria que para optar al grado de Doctor en Farmacia presenta

María José Cano Cebrián

Valencia, Abril 2008

UMI Number: U607774

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607774

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346



Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

Los que suscriben, **Dra. Ana Polache Vengut** y **Dr. Luis Granero Maciá**,
Profesores Titulares del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por Dña María José Cano Cebrián
que lleva por título: “**Aportaciones al Estudio de la Farmacología del
Acamprosato**” ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos
necesarios para su juicio y calificación.

Los que suscriben en Valencia, a 15 de Abril de 2008

Fdo. Dra. Ana Polache Vengut

Fdo. Dr. Luis Granero Maciá

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias al Proyecto "Papel de la interacción entre los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico en el síndrome de dependencia alcohólica: efectos del acamprosato" financiado por el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio del Interior, y con ayuda de una beca predoctoral asociada a dicho proyecto de Investigación.

A Ana y Luis

*A mis padres,
Julio y Rosario*

INTRODUCCIÓN.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. ANTECEDENTES.....	13
<i>1.1. Adicción y recaídas.....</i>	<i>15</i>
<i>1.2. Craving y recaídas en el consumo de alcohol.....</i>	<i>20</i>
<u>1.2.1. Craving.....</u>	<u>20</u>
<u>1.2.2. Modelos animales utilizados para medida de la recaída.....</u>	<u>22</u>
<u>1.2.3. Sustratos neuronales implicados en el craving y la recaída en el consumo de alcohol y otras drogas.....</u>	<u>27</u>
1.2.3.1. Estudios en humanos.....	28
1.2.3.2. Estudios en animales.....	33
<u>1.2.4. Manipulaciones farmacológicas con efecto en la recaída.....</u>	<u>38</u>
1.2.4.1. Antagonistas de los receptores opioides.....	39
1.2.4.2. Fármacos con acción sobre el sistema serotoninérgico.....	42
1.2.4.3. Antagonistas de los receptores para el factor liberador de corticotropina (CRF).....	44
1.2.4.4. Acamprosato.....	46
1.3. Mecanismo de acción del acamprosato.....	48
<u>1.3.1. Interacción con los receptores NMDA.....</u>	<u>49</u>
<u>1.3.2. Bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje.....</u>	<u>53</u>
<u>1.3.3. Cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA.....</u>	<u>55</u>
<u>1.3.4. Interacción del acamprosato con los receptores metabotrópicos grupo mGluR5.....</u>	<u>56</u>

1.4. Objetivos del presente trabajo.....	59
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
2.1 Experimentos de microdiálisis.....	63
<u>2.1.1. Soluciones de trabajo y compuestos utilizados.....</u>	<u>63</u>
2.1.1.1. Solución de fluido cerebroespinal artificial (aCSF).....	63
2.1.1.2. Acamprosato.....	64
2.1.1.3. Acido N-metil-D-aspartico.....	65
2.1.1.4. Acido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico.....	66
2.1.1.5. Acido DL-2-amino-5-fosfopentanoico.....	66
2.1.1.6. Baclofen.....	67
<u>2.1.2. Animales de experimentación.....</u>	<u>68</u>
<u>2.1.3. Sondas de microdiálisis.....</u>	<u>69</u>
<u>2.1.4. Implantación de una sonda de microdiálisis. Estereotaxia....</u>	<u>72</u>
<u>2.1.5. Protocolo experimental.....</u>	<u>74</u>
2.1.5.1. Efectos del acamprosato perfundido en NAc sobre los niveles extracelulares de DA en NAc.....	75
2.1.5.2. Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA inducida por NMDA y PDC en NAc.....	76
2.1.5.2.1. Efecto del NMDA.....	76
2.1.5.2.2. Efecto del PDC.....	77
2.1.5.3. Efecto del AP-5 sobre la liberación de DA inducida por acamprosato en NAc.....	78
2.1.5.4. Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA en NAc mediada por la estimulación química del Hipocampo ventral (vHip).....	79
2.1.5.5. Efecto del acamprosato perfundido localmente en VTA sobre los niveles de DA extracelular en NAc.....	80

<u>2.1.6. Cuantificación de DA en los dializados.....</u>	81
<u>2.1.7. Confirmación de la posición de la sonda.....</u>	82
<u>2.1.8. Evaluación de la técnica analítica: linealidad, exactitud y reproducibilidad.....</u>	83
<u>2.1.9. Análisis de los resultados y métodos estadísticos.....</u>	84
2.2. Experimentos de western-blot.....	85
<u>2.2.1. Soluciones de trabajo y anticuerpos.....</u>	85
2.2.1.1. Tampón de lisis RIPA.....	85
2.2.1.2. Tampón de carga.....	86
2.2.1.3. Tampón de electroforesis.....	86
2.2.1.4. Tampón de transferencia.....	87
2.2.1.5. TBS pH 7.5.....	88
2.2.1.6. Bloqueo de la membrana. Solución de leche al 5%.....	88
2.2.1.7. Marcadores de peso molecular.....	88
2.2.1.8. Anticuerpos.....	89
<u>2.2.2. Animales de experimentación.....</u>	90
<u>2.2.3. Protocolo experimental.....</u>	91
2.2.3.1. Tratamiento agudo con acamprosato.....	91
2.2.3.2. Tratamiento crónico con acamprosato.....	91
<u>2.2.4. Obtención y preparación de las muestras.....</u>	92
2.2.4.1. Lisado y determinación de la cantidad de proteína.....	94
2.2.4.2. Preparación de geles y siembra de muestras.....	95
<u>2.2.5. Electroforesis, transferencia a membrana, revelado y cuantificación.....</u>	97
<u>2.2.6. Re-hibridación de las membranas.....</u>	99
<u>2.2.7. Evaluación de la técnica analítica: Ensayo de linealidad.....</u>	100

2.2.8. Expresión de los resultados.....100

3. RESULTADOS.....**101**

3.1. Experimentos de microdiálisis.....**103**

3.1.1 Evaluación de la técnica analítica. Ensayo de exactitud y reproducibilidad.....103

3.1.2 Caracterización de la farmacología del acamprosato.....104

3.1.2.1. Niveles basales de DA.....104

3.1.2.2. Efecto de la perfusión local de acamprosato en los niveles extracelulares de DA en NAc.....105

3.1.2.3. Efecto del acamprosato en los niveles de DA extracelular en NAc inducidos por NMDA y PDC.....110

3.1.2.3.1. Efecto del acamprosato sobre los cambios inducidos por el NMDA en los niveles de DA extracelular en NAc.....110

3.1.2.3.2. Efecto del acamprosato sobre los cambios inducidos por PDC en los niveles de DA extracelular en NAc117

3.1.2.4. Efectos del AP5 en los niveles de DA extracelular en NAc inducidos por acamprosato.....121

3.1.2.5. Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA en NAc mediada por la estimulación química del Hipocampo ventral.....125

3.1.2.6. Efecto de la perfusión de acamprosato en VTA sobre los niveles de DA extracelular en NAc.....129

3.1.3. Validación de la sonda de microdiálisis.....135

3.2. Experimentos de western-blot.....**139**

3.2.1. Evaluación de la técnica: ensayo de linealidad.....139

3.2.2. Tratamiento agudo con acamprosato.....143

3.2.2.1. Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA.....143

3.2.2.2. Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA.....	145
3.2.2.3. Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA.....	147
3.2.3. Tratamiento crónico con acamprosato.....	149
3.2.3.1. Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA.....	149
3.2.3.2. Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA.....	151
3.2.3.3. Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA.....	153
4. DISCUSIÓN.....	155
4.1. Experimentos de microdiálisis.....	157
4.1.1. Caracterización de la farmacología del acamprosato.....	157
4.1.2. <u>Efecto del acamprosato sobre el incremento de DA extracelular causado por la estimulación química del Hipocampo ventral (vHip).....</u>	166
4.1.3. <u>Efecto de la perfusión local de acamprosato en VTA sobre los niveles extracelulares de DA en NAc.....</u>	168
4.2. Efecto del acamprosato en la expresión de subunidades del receptor NMDA en distintas áreas cerebrales.....	176
4.2.1. <u>Tratamiento agudo con acamprosato.....</u>	179
4.2.2. <u>Tratamiento crónico con acamprosato.....</u>	184
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	191
6. BIBLIOGRAFIA.....	195

Introducción

Las recaídas en el consumo de alcohol constituyen uno de los problemas más importantes con los que se enfrentan, el paciente alcohólico sometido a tratamiento deshabitador por un lado, y el equipo clínico que lo trata por otro. Hasta hace relativamente poco tiempo, el arsenal terapéutico disponible para este tipo de tratamientos quedaba restringido a los fármacos aversivos (disulfiram, cianamida..) que junto con el tratamiento psicoterapéutico constituían los pilares básicos de las actuaciones clínicas.

Los avances en la comprensión de las **bases neurobiológicas** de la dependencia alcohólica, junto con la introducción en España en 1997, en los países de la UE en el 1995, y en EEUU en el año 2004, del acamprosato parecen abrir un esperanzador panorama ante un problema difícil como es el alcoholismo.

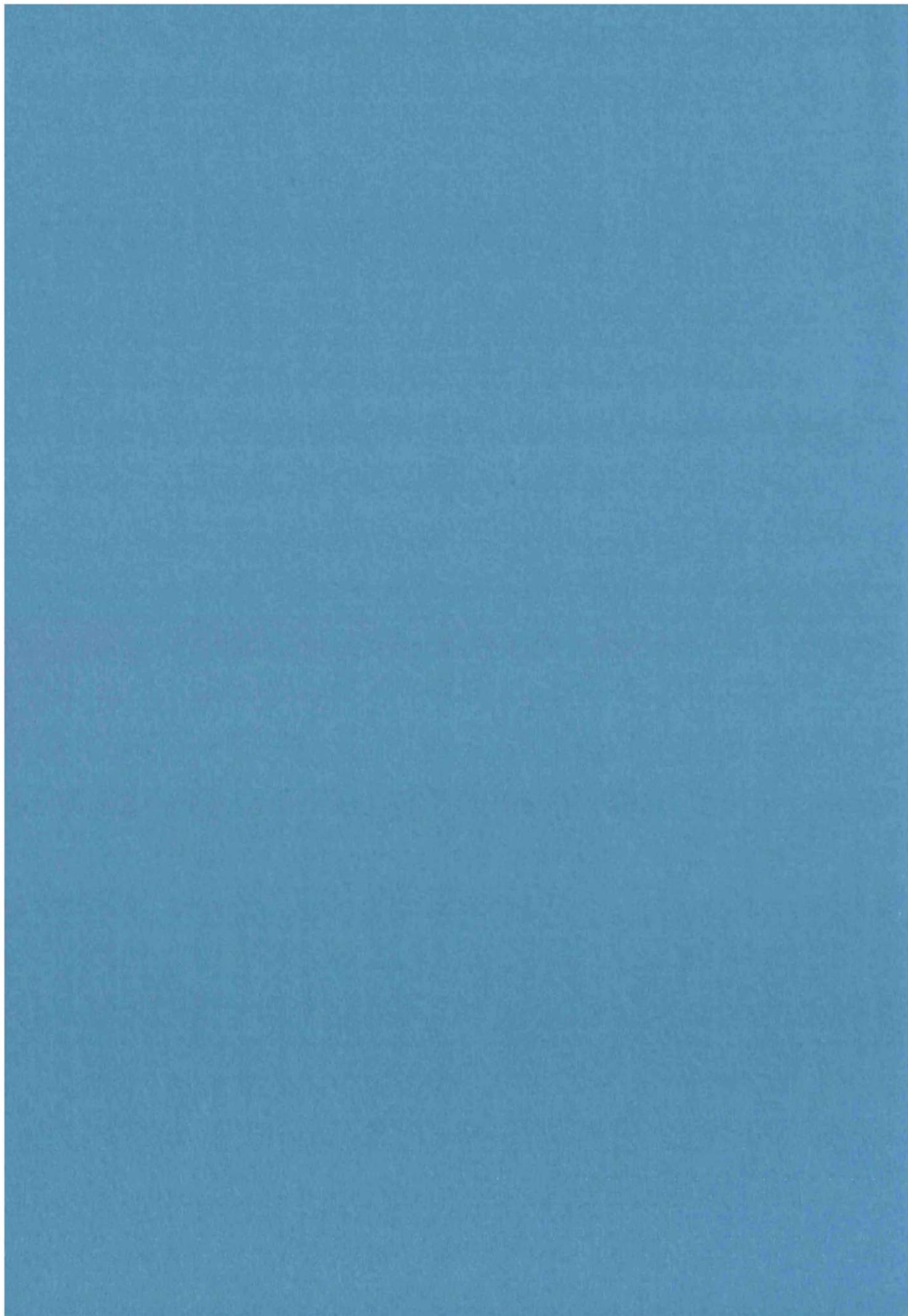
Sin embargo, y a pesar de estas aportaciones, todavía existen importantes lagunas en el conocimiento íntimo de los mecanismos involucrados en fenómenos como el de las recaídas, que dificultan la consecución de mejores resultados en los tratamientos. Tampoco favorece la situación la falta de datos concluyentes sobre el mecanismo de acción del acamprosato, fármaco que fue introducido en terapéutica por su acción anti-craving y preventiva de las recaídas en el consumo de alcohol, y del que todavía hoy se desconocen aspectos relevantes de su mecanismo de acción. Debe insistirse en este último punto, pues un conocimiento más profundo sobre estos aspectos posibilitaría la síntesis dirigida de nuevos fármacos, con características biofarmacéuticas y farmacocinéticas más favorables que las del acamprosato y con un perfil farmacodinámico optimizado.

La Memoria que se presenta pretende realizar aportaciones, creemos que relevantes, en el conocimiento del mecanismo de acción del acamprosato por el cual ejerce sus acciones anticraving y preventiva de las recaídas.

LISTADO DE ABREVIATURAS:

ADE	Efecto de privación de alcohol
Amg	Amígdala
AMPA	amino-3-hidroxi-5-metiloxacol-4-propionato
AMPc	Adenosin mono fosfato cíclico
AP5	Acido DL-2-amino fosfopentanoico
BLA	Amígdala basolateral
CCA	Corteza Cingulada Anterior
COF	Corteza Orbitofrontal
CRF	Factor Liberador de Corticotropina
DA	Dopamina
DLC	Cortex Dorso Lateral
DLPC	Cortex Prefrontal Dorso Lateral
DS	Estriado Dorsal
fMRI	Resonancia magnética funcional
GF	Giro Frontal
GL	Giro Lingual
GO	Giro Occipital
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
iGlu	Receptores ionotrópicos para Glutamato
GTP	Guanosin tri-fosfato
5HT	Serotonina (5-hidroxi triptamina)
Hip	Hipocampo
ICV	Intra cerebro ventricular
iGlu	Receptores ionotrópicos para glutamato
i.p.	Intra peritoneal
LDT	Tegmento Latero Dorsal
LNT	Núcleo Lateral Tegmental
mPFC	Corteza Prefrontal medial
mGF	Giro Frontal medial
mGlu	Receptores metabotrópicos para glutamato
MSN	Neuronas espinosas de tamaño medio en NAc (Médium spiny neurons)
Nac	Núcleo Accumbens
NMDA	N-metil D-aspartato
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
PDC	Acido L-trans pirrolidin-2, 4-dicarboxílico
PFC	Corteza Prefrontal
PKA	Protein kinasa A
s.c.	Subcutanea
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SEM	Error estándar
SNC	Sistema Nervioso Central
TA	Tálamo anterior
TL	Tálamo
Tu	Tubérculo olfatorio
vHip	Hipocampo ventral
VP	Pálido Ventral
VS	Estriado Ventral
VTA	Área Tegmental Ventral

*Capítulo 1:
Antecedentes*



1.1. ADICCIÓN Y RECAÍDAS

La adicción a drogas (también llamada en algunos textos, “dependencia de sustancias”) es un desorden crónico y recurrente, caracterizado por una búsqueda y un consumo compulsivo de la droga, con pérdida de control para limitar su ingesta. Además se caracteriza por la emergencia de un estado mental negativo (por ejemplo, disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando el acceso a la droga se evita. La adicción debe considerarse una enfermedad crónica, recidivante, en la que la sustancia consumida pasa a ocupar un lugar preeminente en la vida del individuo, afectando no sólo al normal equilibrio de sus funciones vitales, sino también las actividades sociales, laborales o recreativas. El dependiente a sustancias presenta un grupo de síntomas cognitivos, comportamentales y fisiológicos muy característicos que indican que el individuo continúa consumiendo la sustancia, a pesar de ser consciente de la aparición de problemas importantes relacionados con el consumo.

Aunque se han dado muchas definiciones del fenómeno de la adicción, tal vez la manera más exhaustiva de abarcar todo el complejo de síntomas que caracterizan este trastorno sea a través de los criterios diagnósticos empleados en el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 4ª edición). Según este texto, la dependencia de sustancias es:

“Un patrón desadaptativo de consumo de la sustancia que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por tres (o más) de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

1. *Tolerancia, definida por cualquiera de los siguientes ítems:*
 - i. *una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado*
 - ii. *el efecto de las mismas cantidades de sustancia disminuye claramente con el consumo continuado*

2. *Abstinencia, definida por cualquiera de los siguientes ítems:*
 - i. *el síndrome de abstinencia característico para la sustancia*
 - ii. *se toma la sustancia (o una muy parecida) para aliviar o evitar los síntomas de la abstinencia*

3. *La sustancia se toma con frecuencia en cantidades mayores o durante un periodo más largo de lo que inicialmente se pretendía*

4. *Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de la sustancia*

5. *Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia (por ejemplo visitar a varios médicos o desplazarse largas distancias), en el consumo de la sustancia (por ejemplo fumar un pitillo tras otro) o en la recuperación de los efectos de la sustancia*

6. *Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia*

7. *Se continúa tomando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia (por ejemplo, consumo de la cocaína a pesar de saber que provoca depresión, o continuada ingesta de alcohol a pesar de que empeora una úlcera)."*

Aunque no está incluida específicamente en los criterios diagnósticos del DSM-IV, la necesidad irresistible de consumo (el denominado *craving* en terminología anglosajona) se observa en la mayoría de los pacientes con dependencia a sustancias. Es más, otros textos, como el CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades, OMS, 10ª revisión), si añaden, de modo explícito, un criterio diagnóstico adicional a los 7 anteriores (que aquí aparecen condensados en 6) del DSM-IV, que hace referencia al *craving*:

"El diagnóstico de dependencia sólo debe hacerse si durante algún momento en los doce meses previos o de un modo continuo, han estado presentes tres o más de los rasgos siguientes:

- a) Deseo intenso o vivencia de una compulsión por consumir una sustancia.*
- b) Disminución de la capacidad para controlar el consumo de una sustancia o alcohol, unas veces para controlar el comienzo del consumo y otras para poder terminarlo, para controlar la cantidad consumida.*
- c) Síntomas somáticos de un síndrome de abstinencia cuando el consumo de la sustancia se reduzca o cese, cuando se confirme por: el síndrome de abstinencia característico de la sustancia; o el*

consumo de la misma sustancia (o de otra muy próxima) con la intención de aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

d) Tolerancia, de tal manera que se requiere un aumento progresivo de la dosis de la sustancia para conseguir los mismos efectos que originalmente producían dosis más bajas (son ejemplos claros los de la dependencia al alcohol y a los opiáceos, en las que hay individuos que pueden llegar a ingerir dosis suficientes para incapacitar o provocar la muerte a personas en las que no está presente una tolerancia).

e) Abandono progresivo de otras fuentes de placer o diversiones, a causa del consumo de la sustancia, aumento del tiempo necesario para obtener o ingerir la sustancia o para recuperarse de sus efectos.

f) Persistencia en el consumo de la sustancia a pesar de sus evidentes consecuencias perjudiciales, tal y como daños hepáticos por consumo excesivo de alcohol, estados de ánimo depresivos consecutivos a períodos de consumo elevado de una sustancia o deterioro cognitivo secundario al consumo de la sustancia.”

Los criterios diagnósticos de la adicción han ido evolucionando a lo largo de los años. De un énfasis especial en los fenómenos de tolerancia y dependencia física que caracterizan la adicción (criterios 1 y 2 del DSM-IV), se ha pasado a un conjunto de criterios más amplio, focalizado, no sólo en los dos antes mencionados, sino también en el carácter compulsivo del uso de la sustancia y en la pérdida de control sobre el consumo.

Tal vez el aspecto más preocupante de la adicción sea su carácter crónico. En efecto, las consecuencias médicas, sociales y ocupacionales

de esta enfermedad muy a menudo no desaparecen tras el abandono del consumo por parte del paciente. Las drogas generan cambios en determinados sistemas del cerebro que perduran largo tiempo después de abandonar el uso de la droga. La naturaleza duradera de estos cambios sitúa a los individuos adictos en un estado de elevado riesgo de **recaída**; de hecho, algunos autores han estimado que el riesgo de recaída es mayor del 60% en el primer año que sigue al abandono del consumo (McLellan et al 2000). Las recaídas son, por tanto, uno de los mayores problemas con los que se enfrentan el adicto que desea abandonar el consumo de drogas, por un lado, y el terapeuta que lo trata, por otro.

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. Responder a cuestiones tales como: ¿qué sistemas cerebrales se ven modificados por el uso crónico de una droga?, ¿cómo provocan esos cambios tan dramáticos las distintas drogas, presentando como presentan una naturaleza química tan diferente? o ¿en qué consisten esos cambios? constituye uno de los retos intelectuales más relevante con los que se enfrenta la comunidad científica dedicada al estudio de esta enfermedad.

Hasta hace relativamente poco, existía una visión, comúnmente aceptada dentro de la comunidad científica, que asumía que una comprensión de los factores neurobiológicos implicados en los fenómenos de refuerzo a las drogas podría llevar al desarrollo de farmacoterapias efectivas para la prevención de las recaídas en individuos abstinentes. Sin embargo, cada vez es más patente, tal y como señalan Berke y Hyman (2000), que el conocimiento de estos factores puede no ser suficiente para explicar por

qué, incluso tras largos periodos de abstinencia, los individuos adictos siguen siendo altamente vulnerables a la recaída. Hoy día existen algunas pruebas que sugieren que los mecanismos implicados en la recaída pueden estar claramente dissociados de los que subyacen al fenómeno del refuerzo y, por tanto, parece necesario diseñar modelos y experiencias que se centren específicamente en la recaída.

1.2. CRAVING Y RECAÍDAS EN EL CONSUMO DE ALCOHOL

1.2.1. *Craving*

Muchos alcohólicos y, muy especialmente, aquellos que intentan mantenerse abstinentes, es decir, que intentan abandonar el consumo de alcohol, experimentan una sensación subjetiva, que a menudo describen como una sensación que les obliga a beber, que se ha venido en denominar *craving*. La experiencia del craving por parte de algunos pacientes puede extenderse a lo largo de periodos de tiempo prolongados y, hoy día, se asume que puede ser la causa de la pérdida del control sobre el uso de alcohol y, sobre todo, de las recaídas en un elevado porcentaje de los casos.

A pesar de que existe un cierto consenso en cuanto a que los alcohólicos y otros adictos experimentan craving, a día de hoy no existe una definición comúnmente aceptada por la comunidad científica, lo que ha impedido, por un lado, que los clínicos puedan desarrollar métodos y, por tanto, medir de un modo preciso los niveles de craving de sus pacientes

y, por otro, que los investigadores puedan avanzar en el análisis de los mecanismos neurobiológicos subyacentes al craving.

En general, el craving puede aparecer en los alcohólicos en dos etapas claramente diferenciadas: durante las fases iniciales de la abstinencia y en las fases tardías de la terapia. Los factores desencadenantes y, probablemente, los sustratos neuronales involucrados en cada etapa se cree que son completamente diferentes. Así, durante las fases iniciales de la abstinencia, sea ésta auto impuesta conscientemente por el paciente o bien forzada, los mecanismos cerebrales que se habían adaptado a la presencia continuada del alcohol en el cerebro, “quedan abandonados” en ese estado alterado. Esta situación de desequilibrio no compensado, debido a la ausencia de la droga, es la que lleva al estado de ansiedad, hiperactividad cardiovascular, alteraciones del sueño, depresión, falta de motivación, problemas de concentración... que caracterizan los periodos de abstinencia. Estos síntomas, que en ocasiones pueden perdurar durante semanas o meses, se asocian por parte del paciente con una sensación de incomodidad y pueden llevar al deseo de consumir alcohol para sentirse de nuevo (en palabras de muchos alcohólicos) “normal”. Puesto que si persiste la abstinencia, la mayor parte de los sistemas corporales alterados por la presencia continuada de alcohol se readaptan y vuelven a su situación original, el paciente puede experimentar una reducción clara de los episodios de craving.

Sin embargo, parece claro que no todos los sistemas cerebrales vuelven a su estado inicial tras el cese del consumo de alcohol, pues ex-alcohólicos que llevan incluso muchos años sin consumir alcohol, pueden experimentar episodios de craving, episodios que pueden acabar en una recaída en el consumo descontrolado de alcohol. Algunos autores (Anton 1999) piensan que este craving tardío es causado por los recuerdos del paciente acerca de “lo que le agradaba cuando bebía”. Distintas

situaciones que el paciente experimentó como placenteras o incluso que advirtió que aliviaban su estrés cuando bebía, pueden desencadenar, de modo tardío, el craving. La descripción dada de este tipo de situaciones, que algunos modelos psicológicos del craving asumen (Anton 1999; Drobles and Anton, 2000), recuerda en gran medida las relaciones estímulo-respuesta del condicionamiento clásico. Algunas de las terapias psicológicas del alcoholismo intentan preparar al paciente para reconocer este craving tardío, al tiempo que le aportan estrategias para manejar ese craving o esas situaciones desencadenantes de craving (Fuller and Hiller-Sturmhöfel, 1999; Longabaugh and Morgenstern 1999). Fármacos como el acamprosato, como luego se expondrá, se cree que evitan la iniciación y/o amplificación de los procesos neuroquímicos relacionados con el craving.

1.2.2. Modelos animales utilizados para la medida de la recaída

Algunos estudios clínicos y de laboratorio en seres humanos han identificado y clasificado un conjunto de factores susceptibles de desencadenar recaída en el consumo de alcohol (Marlatt, 1996). En la clasificación propuesta aparecen tres tipos generales de situaciones capaces de ocasionar episodios de recaída:

1) situaciones intra e interpersonales que implican o desencadenan un estado emocional negativo como ansiedad, depresión, frustración, suponen, en el estudio citado, el desencadenante de hasta un 50% de los episodios de recaída.

2) la presión social, directa o indirecta, que incita a beber al paciente, supuso la causa de hasta el 20% de las recaídas.

3) las situaciones emocionales positivas derivadas de la exposición a estímulos asociados con la bebida como celebraciones, anuncios de bebidas, entrada en un bar, etc. que desencadenan craving, constituyeron el porcentaje restante.

Las diferentes escuelas de psicología clínica han propuesto diferentes estrategias generales y específicas para el manejo, por parte del paciente, de estas situaciones con la finalidad de prevenir las recaídas (Fuller and Hiller-Sturmhöfel 1999), aunque desgraciadamente, a día de hoy, la Neurobiología todavía no ha deslindado de un modo preciso los mecanismos neurobiológicos subyacentes

La investigación preclínica, ha perseguido la puesta a punto de distintos modelos animales que permitieran el análisis detallado de las causas, los mecanismos y circuitos neurales involucrados en las recaídas. Fruto de esa búsqueda han surgido dos modelos experimentales generales que permiten abordar dicho estudio: el denominado ADE, siglas de "*Alcohol Deprivation Effect*", y los llamados modelos de reanudación o "*reinstatement*" en terminología anglosajona.

Curiosamente, el efecto desencadenante de las recaídas de los tres tipos generales de causas de recaída en humanos antes comentados, ha podido ser reproducido en estos modelos animales, lo que ha abierto unas insospechadas posibilidades de investigación.

El ADE 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 1968. En su estudio, ratas macho fueron entrenadas inicialmente para consumir alcohol utilizando un procedimiento en el que los animales podían elegir entre dos botellas de bebida disponibles las 24

horas del día, una con una solución de etanol y la otra con agua. Cuando el consumo de alcohol se estabilizó, la botella con alcohol se eliminó durante distintos periodos de tiempo dependientes del grupo experimental. Tras ese periodo, la botella con alcohol fue reintroducida, observándose un aumento significativo en el consumo de alcohol en las primeras horas tras la reintroducción, volviendo los valores de alcohol consumido a los existentes antes de la deprivación, aproximadamente a las 48 horas de la reexposición a la droga.

Desde este estudio, el ADE ha sido descrito no sólo en rata (Heyser et al 1997; Holter and Spanagel 1999; McKinzie et al 2000; Rodd-Henricks et al 2000; Sinclair and Li 1989) sino también en ratón (Salimov et al 1993), mono (Kornet et al 1991) y también en humanos (Burish et al 1981). El ADE también se puede estudiar utilizando procedimientos en los que el animal de experimentación aprende a autoadministrarse la droga (Heyser et al 1997; Holter et al 1997). Curiosamente el ADE se observa, incluso de modo repetitivo, si los ciclos de deprivación se repiten, siendo además su intensidad dependiente de la duración del periodo de abstinencia (Heyser et al 1997; Spanagel and Holter 2000) (ver **Figura 1.1**)

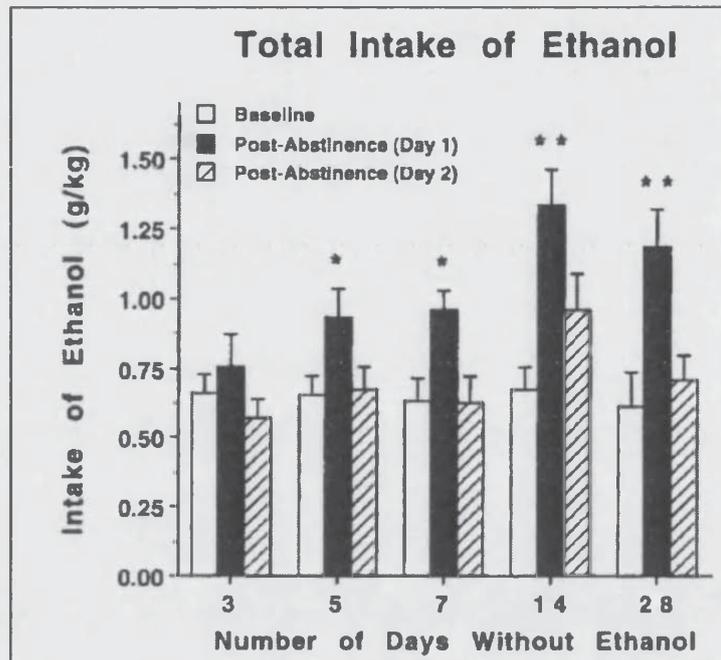


Figura 1.1. Representación gráfica en la que se muestra la medida del ADE después de distintos periodos de abstinencia (3, 5, 7, 14 y 28 días). Las ratas fueron entrenadas para auto administrarse alcohol durante aproximadamente 40 días. En la gráfica se representa el consumo total de etanol en g/kg de peso del animal justo antes de la privación (baseline, barra color blanco), el primer día post-abstinencia (barra color negro), y el segundo día post-abstinencia (barra rayada) durante los 30 minutos que duró la sesión experimental. La mayor ingesta de alcohol se produjo a los 10-15 minutos del comienzo del experimento (datos no mostrados).

Como podemos observar, el consumo de alcohol aumentó en función del número de días de privación del mismo. Este aumento fue temporal, volviendo a los niveles basales de consumo al segundo o tercer día de post-abstinencia en todos los casos. Los datos se presentaron como media \pm SEM. (*) Indica diferencias significativas respecto al nivel basal. (**) Indica diferencias significativas respecto al basal y a los grupos de animales en los cuales el periodo de abstinencia fue de 3, 5 y 7 días. Figura tomada de Heyser et al, 1997.

Los mecanismos responsables del ADE no están claros. Es importante señalar que el fenómeno de incremento del consumo tras periodos de privación no es exclusivo del alcohol, pudiendo también detectarse con otras drogas de abuso, otras sustancias como la sacarina, la sal (de escaso o dudoso poder reforzante), o incluso con otros comportamientos consumatorios como el comportamiento sexual (Neznanova et al, 2002).

En conjunto, los datos disponibles permiten considerar el ADE como un modelo aceptable para el estudio de la recaída en el consumo de alcohol (Li, 2000; Spanagel and Holter, 2000), aunque, es cierto, que el modelo difiere en determinados aspectos de la situación habitual en humanos. Por ejemplo, se ha criticado que, en 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 reexposición a la droga y, por tanto, la motivación que, en humanos, antecede a la búsqueda de la droga no es analizada por el modelo.

En los modelos de reanudación, los sujetos experimentales son entrenados inicialmente para auto administrarse, por vía oral, intravenosa o intracraneal, la droga gracias al accionamiento de una palanca activa existente en una jaula de condicionamiento operante que presenta, también, una segunda palanca inactiva. Una vez se consigue una respuesta de auto administración estable, el comportamiento puede extinguirse si se elimina la droga de la disolución de administración. Tras la extinción, la administración no contingente (por parte del investigador y no coincidente con el accionamiento de la palanca activa por parte del animal) de la droga, o la exposición a estímulos diferentes a la droga, puede provocar la reanudación del comportamiento de palanqueo, es decir, de auto administración. En estos estudios se miden dos tipos de variables: el número de veces que el animal acciona la palanca activa,

palanca que, en efecto, conduce a una administración de la droga, y, por otro lado, el número de veces que el animal acciona la palanca inactiva. Las respuestas activas se asume que reflejan la reanudación de la búsqueda de la droga, mientras que las respuestas inactivas se interpretan como el reflejo de una respuesta inespecífica o de una generalización de las respuestas.

El modelo de reanudación ha sido criticado por diferentes autores y bajo diferentes perspectivas (véase Marlatt, 1996; Dworkin et al, 1995; Hemby et al, 1997; Markou et al, 1999; Everitt and Robbins, 2000) pero, a pesar de sus limitaciones este modelo parece tener un excelente valor predictivo (Epstein et al, 2006), pues los factores que en humanos provocan la recaída en el consumo de alcohol u otras drogas (reexposición al alcohol, estímulos asociados al consumo y situaciones que provocan estrés), reanudan de un modo altamente reproducible el comportamiento de autoadministración en animales de experimentación (Self and Nestler, 1998; Shaham et al, 2000; Stewart, 2000).

1.2.3. Sustratos neuronales implicados en el craving y en la recaída en el consumo de alcohol y otras drogas

El craving es, por definición (ver epígrafe 1.2.1), un estado subjetivo descrito por los adictos y, por tanto, no puede medirse directamente en animales de experimentación. Sin embargo, la recaída es un evento que sí puede analizarse de modo objetivo en el laboratorio y utilizando animales como sustrato para la experimentación. A continuación, por tanto, expondremos brevemente, por un lado, los hallazgos más relevantes que los estudios en humanos han aportado en relación con los sustratos neuronales implicados en el craving y las recaídas y, por otro, lo

que los estudios en animales han desvelado en relación con los circuitos que median la recaída.

1.2.3.1. Estudios en humanos.

En los últimos años y gracias a la mejora en las técnicas de neuroimagen, se ha comenzado a estudiar de modo sistemático la relación existente entre el craving y recaída en alcohólicos y adictos a otras drogas, y ciertas estructuras cerebrales. La técnica mayoritariamente empleada en estos estudios ha sido la resonancia magnética funcional (fMRI) que permite la obtención de imágenes del cerebro humano en las que se pueden detectar qué regiones o áreas se activan cuando el individuo lleva a cabo una tarea mental determinada o cuando es expuesto a estímulos, situaciones o agentes farmacológicos determinados.

Mediante el empleo de fMRI, Schneider et al (2001) mostraron que la Amg es activada intensamente ante estímulos de tipo olfativo relacionados con el consumo de alcohol. George et al en 2001 y Myrick et al en 2004, por su parte, mostraron que ciertas zonas del cerebro de pacientes alcohólicos (TA y DLPC en el primer trabajo y NAc izquierdo, CCA y COF izquierda en el segundo) son activadas intensamente ante la presentación de estímulos visuales y gustativos relacionados con bebidas alcohólicas. Esta mayor actividad en las citadas regiones del cerebro se pudo correlacionar, en el trabajo de Myrick et al, de un modo estadísticamente significativo, con el craving descrito por los individuos del ensayo. Grüsser et al en 2004 mostraron en otro trabajo que la intensidad de la activación, inducida por estímulos visuales, de la CCA, el estriado y el mPFC estuvo asociada con un mayor riesgo de recaída.

En el ámbito de la adicción a otras drogas como la cocaína, los estudios de neuroimagen realizados en humanos también han mostrado pautas de activación cerebral similares a las descritas en el alcoholismo. Así, diversos estudios han mostrado que la visión de imágenes relacionadas con el consumo de cocaína activan, de un modo claro y evidente, la CCA (Wexler et al, 2001) al tiempo que los participantes en el estudio pertenecientes al grupo de adictos mostraron una menor activación de ciertas áreas del lóbulo frontal, en relación a la observada en los individuos no adictos. Curiosamente la activación de la CCA, que fue evidente en todos los pacientes, siempre precedió a la aparición de craving. El craving no fue referido por todos los pacientes aunque sí tuvieron una activación clara de la CCA. Es interesante señalar que, tras el comienzo del craving en los pacientes, nueve zonas estuvieron más activas en los adictos que en los individuos sanos: el Hip derecho, la CCA, el GF superior izquierdo, el mGF, el GL, el GF inferior derecho y el GO superior. Estas mismas zonas fueron también activadas más intensamente en individuos sanos respecto a adictos, cuando los sujetos fueron expuestos a imágenes que evocaban sentimientos de tristeza, lo que parece sugerir un nexo fisiológico entre la respuesta inducida por la visión de imágenes relacionadas con la cocaína y los estados afectivos disfóricos inducidos por ciertas imágenes en individuos sanos.

Otros estudios de neuroimagen en el ámbito de la adicción a la cocaína también han encontrado activación de la CCA tras la exposición de los adictos a imágenes como a la propia droga (Breiter et al, 1997; Maas et al, 1998; Childress et al, 1999; Volkow et al, 1999). La activación de la DLC (Maas et al, 1998) y de la COF (Volkow et al, 1999; Wang et al, 1999) también ha sido descrita en la bibliografía en diferentes estudios.

Recientemente, el grupo de trabajo liderado por Nora Volkow (Volkow et al, 2006), mediante el empleo combinado de la PET y del [¹¹C]raclopride

(un antagonista con gran afinidad por los receptores D2 para la DA) ha aportado datos que muestran que los adictos a cocaína expuestos a estímulos visuales relacionados con el consumo de la droga, experimentan incrementos significativos en los niveles de DA en el DS, aunque no en el VS. Además han podido demostrar una asociación entre la aparición de craving y esos incrementos en los niveles de DA. La aparición de craving en cocainómanos expuestos a situaciones estresantes (Sinha et al, 2005) o a videos con imágenes relacionados con el consumo (Garavan et al, 2000) ha sido también asociada con una activación del DS, aunque por primera vez Volkow y su grupo han implicado al neurotransmisor DA en el fenómeno del craving. Es importante señalar que el DS está implicado en la selección e iniciación de acciones (Graybiel et al, 1994) así como en la mediación de los fenómenos de aprendizaje de relaciones estímulo-respuesta (White and McDonald, 2002), por lo que el descubrimiento de la asociación entre la activación dopaminérgica estriatal y la aparición de craving podría ser el reflejo de la naturaleza habitual (en el sentido de hábito o respuesta automatizada) del craving.

En conjunto los diferentes estudios realizados en drogadictos sugieren o muestran una asociación entre el craving y la activación diferencial de ciertas estructuras límbicas, muchas de las cuales son parte o reciben aferencias del sistema dopaminérgico mesolímbico.

Antón en 1999 propuso un modelo inicial de circuito, en el que el estriado, ventral y dorsal, y ciertas regiones de la corteza cerebral, en concreto la DLPC, desempeñarían un papel clave en el desarrollo del craving y, por tanto, en la recaída. En este modelo inicial, la CCA, que en gran parte de

los estudios mencionados, es activada antes de la aparición del craving, no fue recogida. (Figura 1.2).

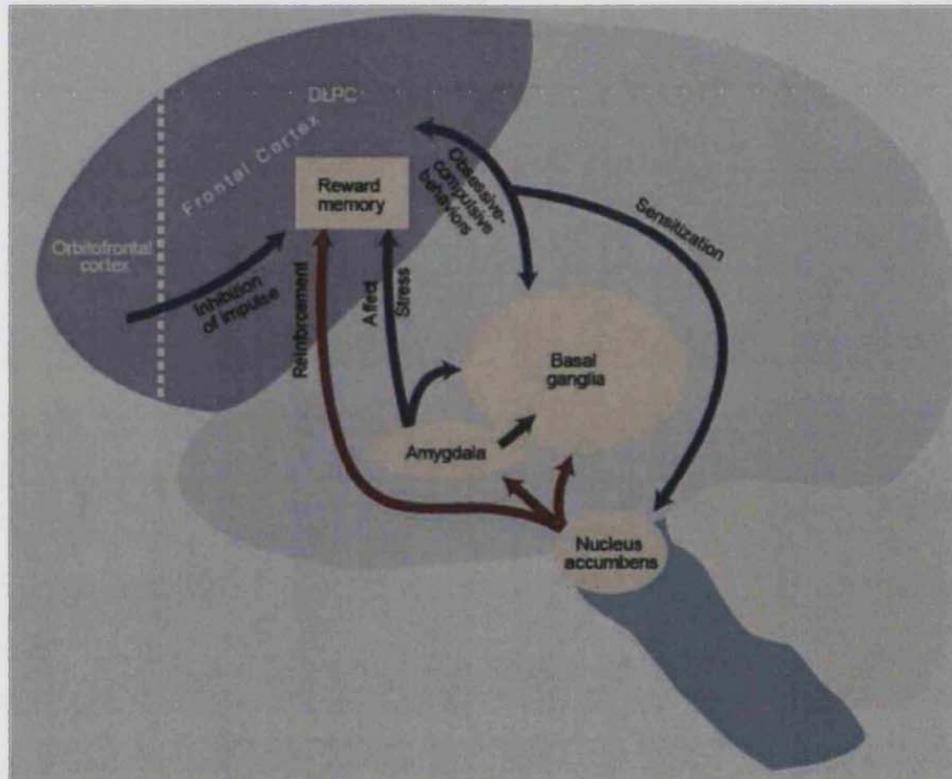


Figura 1.2. Esquema del modelo inicial propuesto por Antón (1999) sobre las regiones cerebrales implicadas en el craving. El alcohol, al igual que sucede con otras drogas de abuso, activa las neuronas del Núcleo accumbens (NAc). Estas neuronas, envían la información a la Amg (la cual se conoce que tiene un papel importante en la modulación del estrés y las emociones), al cortex frontal (incluyendo la región de la DLPC, región del cerebro donde se cree que podría estar localizada la memoria del refuerzo), y por último a los ganglios basales, que juegan un papel importante en los patrones de conducta repetitivos.

Las neuronas localizadas en Amg también envían a su vez información a la DPLC y a los ganglios basales. La DPLC manda información de vuelta a los ganglios basales (que podrían jugar un papel importante en las conductas obsesivo-compulsivas) y al NAc. La retroalimentación producida desde DLPC a NAc podría ser responsable de la sensibilización tras exposiciones repetidas al alcohol. A su vez, la DLPC es controlada por el cortex orbitofrontal. Figura tomada de Anton (1999)

En este modelo se asume como aspecto clave la activación del NAc por el alcohol (un hecho, no exclusivo del alcohol, sino común a todas las drogas de abuso). El NAc reenvía la información a la PFC, incluida la DLPC, a los ganglios basales y a la Amg. Las distintas áreas de la PFC se encargan de integrar toda la información sensorial proveniente de los órganos de los sentidos. En una de esas áreas, la DLPC, se cree que se fijan las memorias relativas a los efectos recompensantes del uso de las drogas de abuso así como su valor atribuido (Kalivas et al, 1998). Según Anton, las situaciones que tradicionalmente en la vida del alcohólico (o del adicto a otras drogas) han estado asociadas con el consumo de alcohol (o de la droga), podrían ser recordadas como especialmente valiosas debido a que la DLPC fue activada simultánea e intensamente tanto por la información sensorial asociada con el consumo de alcohol y las drogas como por los axones provenientes del NAc, hecho éste que le atribuiría un valor desmedido a esas memorias. Dado que la DLPC también envía axones al NAc, se ha postulado que cuando esa información sensorial, que tradicionalmente se asoció al consumo de alcohol, se presenta a un individuo abstinentes, se produce una activación de la DLPC que a su vez estimula el NAc.

La actividad de ciertas áreas de la corteza cerebral, incluida la DLPC, son controladas por la COF (un área claramente implicada en el establecimiento de juicios de valor, por ejemplo la evaluación del riesgo y la recompensa de una acción). Se ha postulado que el consumo continuado de alcohol y otras drogas de abuso es capaz de alterar esta función de control de la COF, con lo que al faltar o ser menor su función inhibitoria sobre la DLPC, podrían aparecer comportamientos impulsivos como los que caracterizan los estados obsesivo-compulsivos con los que el craving ha sido comparado (Modell et al, 1992 a,b; Anton et al, 1996). Por ejemplo, los alcohólicos en tratamiento deshabitador pueden

experimentar pensamientos irresistibles y recurrentes en relación con el alcohol, hecho éste que caracteriza claramente los desórdenes obsesivo-compulsivos.

1.2.3.2. Estudios en animales

En la última década, diversos estudios en animales, utilizando cocaína sobre todo como droga de estudio y el modelo de reanudación en rata como técnica experimental, han permitido establecer con cierto detalle un circuito cuyas partes han mostrado ser particularmente relevantes en el fenómeno de la recaída.

El aspecto más relevante que ha surgido de estos estudios ha sido, además de concretar los elementos integrantes más importantes de este circuito, mostrar que los circuitos que median los efectos recompensantes y la recaída en el consumo de las drogas son diferentes. En el circuito que media la recaída, la proyección glutamatérgica procedente de la PFC y dirigida al NAc core y, continuada desde aquí, ya como conexión gabaérgica, hasta el VP, constituye una vía final común que inicia la reanudación del consumo de droga independientemente de que se empleen el estrés, la propia droga o estímulos asociados para desencadenarla. Lógicamente cada modalidad desencadenante de la recaída difiere en las partes iniciales del circuito, es decir, en el subcircuito que media la percepción del estímulo desencadenante, pero al final, todas ellas convergen en las mismas estructuras que median la recaída. A continuación se muestra la configuración del circuito de recaída, aunque para facilitar su análisis se ha presentado su estructura y partes constituyentes en tres figuras diferentes que atienden al tipo de

estímulo desencadenante de la reanudación (estímulos asociados al consumo, la propia droga y el estrés) (**Figura 1.3 a, b y c**). Es importante señalar, en cualquier caso, que la integridad de la proyección glutamatérgica entre PFC y NAc core es crucial para que se manifieste el fenómeno de reanudación, pues diversos estudios han demostrado que la inactivación farmacológica de la PFC en las ratas (por ejemplo con la aplicación directa de mezclas de baclofen y muscimol) impide la reanudación de la autoadministración de cocaína (McFarland et al, 2004; Capriles et al, 2003; McLaughlin and See, 2003; McFarland and Kalivas, 2001).

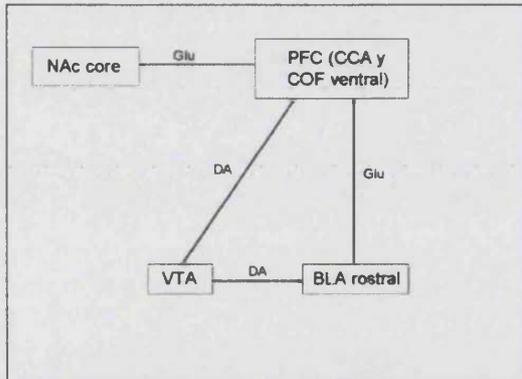


Figura 1.3 a. Reanudación inducida por estímulos asociados al consumo de droga. En la figura se muestra el circuito neural que en opinión de muchos autores media la reanudación inducida por estímulos asociados al consumo. Como se aprecia existe una coincidencia casi completa entre los hallazgos provenientes de los estudios de neuroimagen en humanos antes comentados y los procedentes de los estudios en animales de experimentación. La BLA en su porción rostral y ciertas porciones de la PFC, incluyendo las CCA y COF ventral son estructuras clave en este circuito. En el circuito se incluye asimismo la región core del NAc que recibe aferencias glutamatergicas de las anteriores estructuras, aunque sólo se muestra la procedente de PFC por haberse

demostrado su implicación directa en el fenómeno de reanudación inducida por estímulos asociados (Di Ciano and Everitt, 2001). También se reflejan en el esquema las proyecciones dopaminérgicas procedentes del VTA por su importancia en el fenómeno de reanudación (See et al 2001).

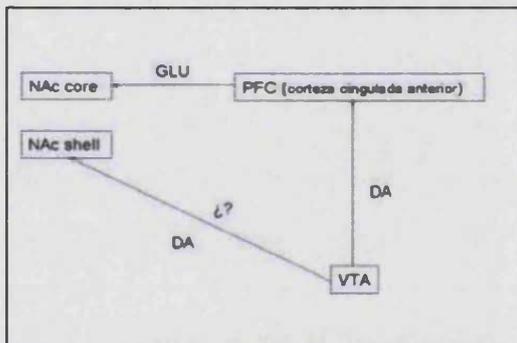


Figura 1.3 b. Reanudación inducida por la propia droga. En la figura se muestra el circuito neural que en opinión de muchos autores media la reanudación inducida por la propia droga. La PFC, incluyendo la CCA y el core del NAc son de nuevo las estructuras clave en este circuito. También se reflejan en el esquema las proyecciones dopaminérgicas procedentes del VTA por su importancia en el fenómeno de reanudación. Se ha incluido la porción shell del NAc, aunque con signos de interrogación, pues algunos autores (Anderson et al 2001) han encontrado que el bloqueo de los receptores D1 en NAc shell es capaz de prevenir la reanudación inducida por la propia cocaína.

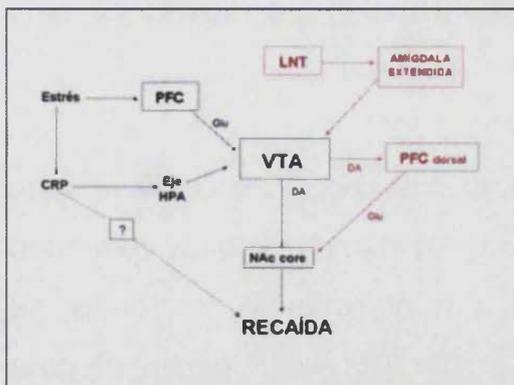


Figura 1.3 c. Reanudación inducida por el estrés. En la figura se muestra el circuito propuesto por Shaham et al, 1997 (color negro), donde se representan los circuitos primarios mediante los cuales el estrés actuaría para provocar la recaída. Situaciones de estrés activarían las proyecciones glutamatergicas hacia VTA desde PFC. Además, el estrés provocaría la liberación del CRF que a su vez activa el eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) con al subsiguiente secreción de corticosterona que incrementaría la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas de VTA a las aferencias excitatorias, provocando la liberación de DA en NAc, pudiendo ser ésta la ruta final común en todos los casos vistos anteriormente, aunque autores como Shaham et al, 1996 postularon que podrían participar en la recaída también

otras regiones el cerebro a través de otros mecanismos independientes donde no participaría la DA. Recientemente, el grupo investigador de Kalivas (Mc Farland et al, 2004) propusieron un circuito (color rojo) para explicar las recaídas mediadas por el estrés, en el que la Amígdala Extendida era activada por el LNT, eje adrenérgico que se activa en situaciones de estrés. Ésta activaría la proyección desde VTA a la PFC dorsal. La liberación de DA en PFC dorsal inicia la reanudación del consumo a través de la proyección glutamatergica de PFC a NAc core y la consiguiente liberación de Glu y DA en NAc core.

Los estudios en animales no sólo han aportado información sobre las estructuras cerebrales integrantes del circuito de la recaída, sino que también han aportado información relativa a los neurotransmisores y receptores involucrados en este fenómeno. Parece claro que el Glu y la DA juegan un papel clave en las recaídas. Diversos estudios han demostrado que la administración localizada en el NAc core, pero no en shell, de antagonistas para los receptores AMPA del glutamato previene la reanudación inducida por estímulos asociados (Di Ciano and Everitt, 2001; Park et al, 2002; Cornish and Kalivas, 2001), del mismo modo que la utilización de distintos tratamientos que previenen la liberación de glutamato en NAc en respuesta al estrés o a la propia droga (McFarland et al 2003, 2004) también impiden la reanudación.

En los circuitos de la **figura 1.3** también se aprecia que distintos núcleos regulan la reanudación en función de la naturaleza del estímulo desencadenante; por ejemplo, la amígdala basolateral (BLA) en su porción rostral está implicada en la reanudación inducida por estímulos asociados al consumo de drogas (Whitelaw et al, 1996; Meil and See, 1997; Kantak et al, 2002), mientras que otros núcleos de la llamada amígdala extendida están implicados en la reanudación inducida por el estrés (Shaham et al, 2000; McFarland et al, 2004).

Para completar este análisis hemos de hablar del papel de la DA en este circuito y, por tanto, en la recaída. Un hecho demostrado es que para desencadenar la reanudación, sea cual sea el estímulo empleado, se requiere actividad en la **vía mesocorticolímbica dopaminérgica** (McFarland et al, 2004; McFarland and Kalivas, 2001; Di Ciano and Everitt, 2001). Sin embargo, aunque los efectos reforzantes de la administración de las drogas de abuso dependen, en opinión de muchos autores, de las elevaciones de la DA en el NAc, la reanudación depende del aumento de los niveles de DA en la PFC y en la Amg (McFarland and

Kalivas, 2001; Capriles et al, 2003; McFarland et al, 2004; See et al, 2001), pero no de su aumento en NAc core (Di Ciano and Everitt, 2001; McFarland and Kalivas, 2001; Cornish and Kalivas, 2001). El aumento de los niveles de DA en la PFC antecede a la activación de la proyección PFC→NAc core, ya que evitando la liberación de DA en la corteza se impide la liberación del Glu en el NAc core inducida por estrés o por la propia droga (McFarland et al 2003, 2004).

Es importante señalar que algunos reputados autores como David Self y Eric Nestler, afirmaron que la liberación de DA en el NAc inducida por los distintos estímulos desencadenantes de la reanudación (administración de la droga, estímulos asociados al consumo y estrés) es la condición necesaria y suficiente para desencadenar la reanudación (Self and Nestler, 1998), lo que está en clara contradicción con lo anteriormente expuesto. Una posible explicación a tal discrepancia, sobre todo en el caso de la reanudación inducida por la propia droga, podría ser que para su análisis, estos autores se basaron fundamentalmente en un conjunto de estudios en los que las distintas condiciones experimentales conducían a aumentos o reducciones (según el caso) de la actividad dopaminérgica; tanto en NAc como en PFC. Así por ejemplo, en algunos de los trabajos citados por Self y Nestler, se manejaban por vía sistémica, tanto agonistas como antagonistas de los receptores para la DA, y, por tanto, la acción de estas sustancias no fue selectiva: la activación o el bloqueo de los receptores se produjo tanto en el NAc como en la PFC.

Sin embargo, no debe descartarse completamente la participación de la DA en el NAc en los fenómenos de recaída. Self y cols en 1998 mostraron que la modulación experimental de la vía del AMPc en el NAc tiene profundos efectos sobre la reanudación. Así la administración bilateral en NAc de inhibidores de la PKA induce la reanudación en la autoadministración de cocaína y es capaz de aumentar los efectos

promotores de la reanudación de una dosis de cocaína. Por el contrario, la infusión bilateral de activadores de la PKA, enmascaran o previenen la reanudación inducida por la cocaína. Del mismo modo, Anderson et al, (2001) también han mostrado que el bloqueo de los receptores D1 en NAc shell es capaz de prevenir la reanudación inducida por cocaína.

1.2.4. Manipulaciones farmacológicas con efecto en la recaída en el consumo de alcohol

En los últimos años han proliferado los estudios experimentales que haciendo uso de alguno de los modelos de recaída anteriormente comentados, han investigado el efecto de diferentes agentes farmacológicos o diferentes manipulaciones experimentales o quirúrgicas (por ejemplo adrenalectomía), sobre la recaída en el consumo de alcohol. A su vez, estos estudios también han ido contribuyendo a desvelar los circuitos y áreas cerebrales implicadas en las recaídas.

A continuación se recogen los hallazgos más relevantes en relación con las manipulaciones farmacológicas que a nivel preclínico, y en algunas ocasiones a nivel clínico, han demostrado eficacia para reducir las recaídas en el consumo de alcohol. Nos hemos centrado fundamentalmente en cuatro grupos de tratamientos:

- antagonistas de los receptores opioides: naltrexona
- fármacos con acción sobre el sistema serotoninérgico
- antagonistas de los receptores para el CRF
- acamprosato

De estos cuatro grandes grupos, el grupo de los antagonistas de los receptores opioides y en concreto la naltrexona, y el acamprosato, han alcanzado una relevancia clínica notable en los últimos años, en especial el acamprosato, que llegó a alcanzar a comienzos del presente siglo cifras de utilización cercanas a 1.4 millones de pacientes alcohólicos a lo largo de los 5 continentes (Mason, 2001).

1.2.4.1. Antagonistas de los receptores opioides.

Existe una evidencia considerable de que los antagonistas de los receptores opioides de tipo μ y δ son capaces de reducir el ADE (**Figura 1.4**) (Badia-Elder et al, 1999, Holter and Spanagel, 1999) o la reanudación inducida por la reexposición a la droga (Lê et al, 1999; Bienkowski et al, 1999) o a estímulos asociados a ella (Katner and Weiss, 1999), aunque son ineficaces para bloquear la reanudación inducida por situaciones estresantes, como las descargas eléctricas en las patas (Lê et al, 1999) (**Figura 1.5**). Estos datos preclínicos avalan el efecto reductor de las recaídas que algunos ensayos clínicos atribuían a la naltrexona, un antagonista de amplio espectro de estos receptores opioides (O'Malley et al, 1992; Volpicelli et al, 1992).

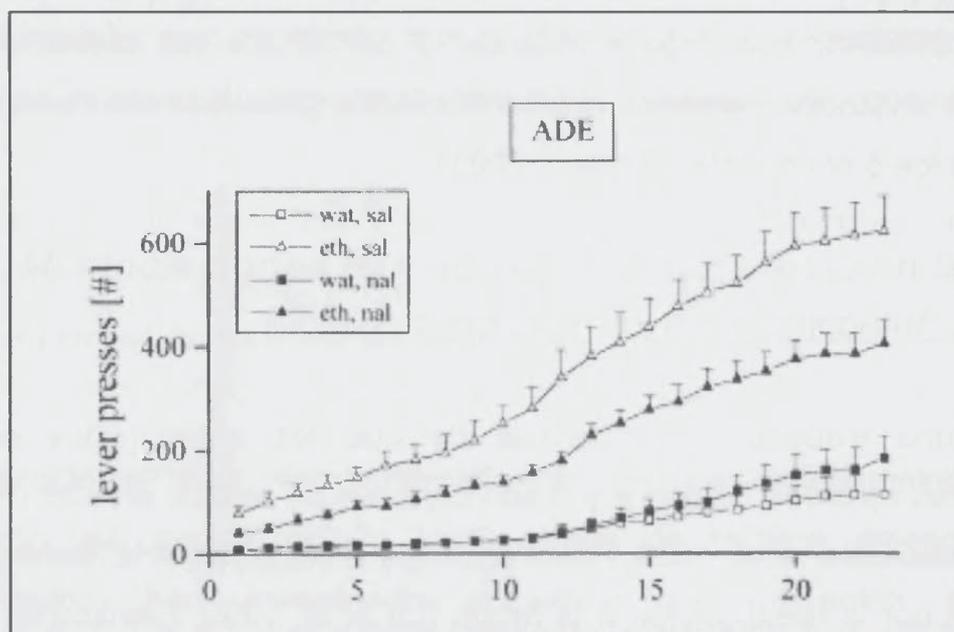


Figura 1.4 Efecto del tratamiento agudo con naltrexona a la dosis de 0.1 mg/kg (administración subcutánea 30 minutos antes del comienzo de la sesión) sobre el número de veces que el animal presiona la palanca activa durante toda la sesión experimental (23 h) agrupados en intervalos de 1h (eje de abcisas). Las ratas fueron entrenadas para auto administrarse etanol durante 11 meses, y tras un periodo de abstinencia de 7 días se inició la sesión. Como se puede observar en la figura, la naltrexona fue capaz de reducir la ingesta de alcohol del animal durante toda la sesión, mientras que no tuvo efecto sobre la ingesta de agua. (□ indica tratamiento con administración subcutánea de solución salina, y sesión experimental con agua únicamente; △ indica inyección subcutánea de solución salina seguida de sesión experimental con etanol. (■) indica inyección previa con naltrexona y sesión experimental con agua. (▲) indica inyección previa con naltrexona y sesión experimental con etanol). Figura tomada de Holter and Spanagel, 1999.

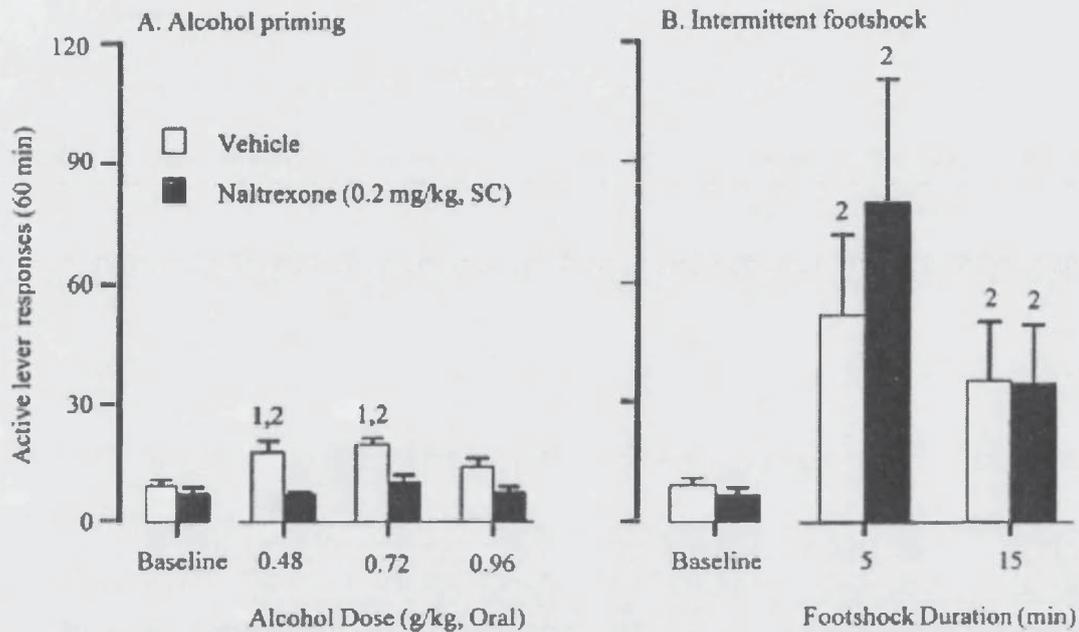


Figura 1.5 Efecto del antagonista de receptores opioides Naltrexona sobre la reanudación en el consumo de alcohol en ratas. Las ratas fueron entrenadas hasta estabilizar su consumo de alcohol diario (1.2 ± 0.07 g/kg) en una cámara de condicionamiento operante con una palanca activa que liberaba 0.19 ml de una solución de etanol (12 % p/v) tras un período de retirada de alcohol, comenzó el experimento de reanudación del consumo sobre dos grupos de animales ($n=9$). A los animales del primer grupo se les inyectó una dosis de salino (barra blanca) y se midió el número de veces que presionaba la palanca en dos situaciones diferentes: administración no contingente de etanol (inducción por reexposición a la droga, gráfica **A**) y aplicación de descargas eléctricas en las patas (inducción provocada por estrés, Gráfica **B**). A los animales del grupo experimental (barra negra) se les inyectó 15 minutos antes de la sesión experimental una dosis de 0.2 mg/kg de Naltrexona, y a continuación se sometieron a las mismas condiciones que el grupo control. El resultado fue que el pretratamiento con naltrexona fue efectivo sobre la reanudación del consumo de alcohol cuando la reanudación era inducida por reexposición a la droga, pero no tuvo efecto cuando la reanudación fue inducida por estrés. Los datos han sido expresados como nº de accionamientos de la palanca activa durante los 60 minutos que duró la sesión experimental. (1) indica diferencias estadísticamente significativas del grupo control frente al grupo tratado con naltrexona. (2) Diferencias significativas con respecto al valor basal del consumo de alcohol. Figura tomada de Lê et al, 1999.

1.2.4.2. Fármacos con acción sobre el sistema serotoninérgico.

Aunque algunos ensayos clínicos han mostrado que fármacos como la fluoxetina (un inhibidor de la recaptación de la serotonina) y el ondansetrón (un antagonista del receptor 5-HT₃) reducen el consumo de alcohol y las tasas de recaída en humanos (Naranjo et al, 1992, 1994; Johnson et al, 2000; aunque ver también Zernig et al, 1997; Johnson and Ait-Daoud, 2000), hasta la fecha los estudios preclínicos no avalan su eficacia en los modelos de ADE y reanudación. Tan sólo la fluoxetina parece haber sido eficaz para evitar la reanudación inducida por estrés aunque no la inducida por la administración no contingente de alcohol (Lê et al, 1999; **Figura 1.6**)

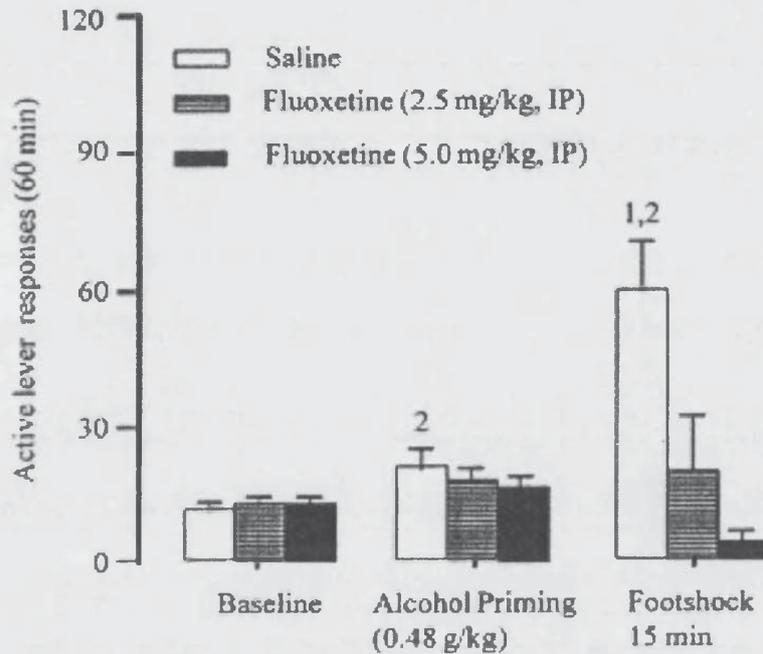


Figura 1.6 Efecto de la fluoxetina (inhibidor de la recaptación de serotonina) sobre el consumo de alcohol en ratas mediante un experimento de reanudación en una cámara de condicionamiento operante en la que había dos palancas, una de ellas activa que suministraba alcohol al presionarla. El experimento constaba de tres grupos de animales ($n=9$) a los que se entrenó para auto administrarse alcohol (12% p/v) durante sesiones de 30 minutos. Una vez que la ingesta de alcohol se estabilizó (1.18 ± 0.05 g/kg al día), los animales de cada grupo fueron sometidos a un periodo de privación de alcohol. Pasado este periodo se midió la reanudación del consumo de alcohol sobre los animales de los tres grupos experimentales después del tratamiento farmacológico ante dos situaciones distintas: tras una inyección de alcohol y tras someterlos a estrés mediante shock eléctrico en las patas.

A los animales del grupo control se les inyectó salino i.p. 15 minutos antes de la sesión experimental (color blanco) y se midió el número de veces que presionaban la palanca activa para obtener alcohol en cada una de las situaciones antes mencionadas. A los animales del grupo experimental se les inyectó una dosis de fluoxetina 2.5 mg/kg i.p. 15 minutos antes del comienzo de la sesión experimental, con las mismas características que para el grupo control. A los animales del segundo grupo experimental se les inyectó una dosis de 5 mg/kg de fluoxetina 15 minutos antes del comienzo del experimento. El resultado global muestra que la fluoxetina no fue capaz de bloquear la recaída en el consumo de alcohol inducida por reexposición a la droga mientras que sí pudo bloquear la recaída en el consumo de alcohol provocada por el estrés de forma dosis dependiente. (1) indica diferencias significativas del control respecto a los grupos experimentales. (2) Indica diferencias significativas frente a los niveles basales respectivos. Figura tomada de Lê et al, 1999.

1.2.4.3. Antagonistas de los receptores para el factor liberador de la corticotropina (CRF).

El CRF fue el primer péptido aislado de una familia de péptidos relacionados (CRF y urocortinas 1, 2 y 3) por primera vez en hipotálamo en 1981 (Vale et al, 1981) que parece estar implicado en la respuesta aguda al estrés. Es más, la hiperactividad de esta vía parece jugar un papel clave en varios desórdenes psiquiátricos como la depresión y la ansiedad, pero también en los trastornos adictivos (Sarnyai et al, 2001). Se han clonado dos subtipos de receptores para este neuropéptido: CRF1 y CRF2 (Behan et al, 1996) aunque el CRF presenta mayor afinidad por el CRF1 (Tache and Bonaz, 2007).

Lê et al demostraron en el 2000 que distintos antagonistas del receptor CRF (algunos de amplio espectro, como el d-Phe-CRF, y otros selectivos del CRF1 como CP154-526) administrados ICV o i.p., son capaces de atenuar de modo dosis-dependiente la reanudación en el consumo de alcohol inducido por estrés (**Figura 1.7**).

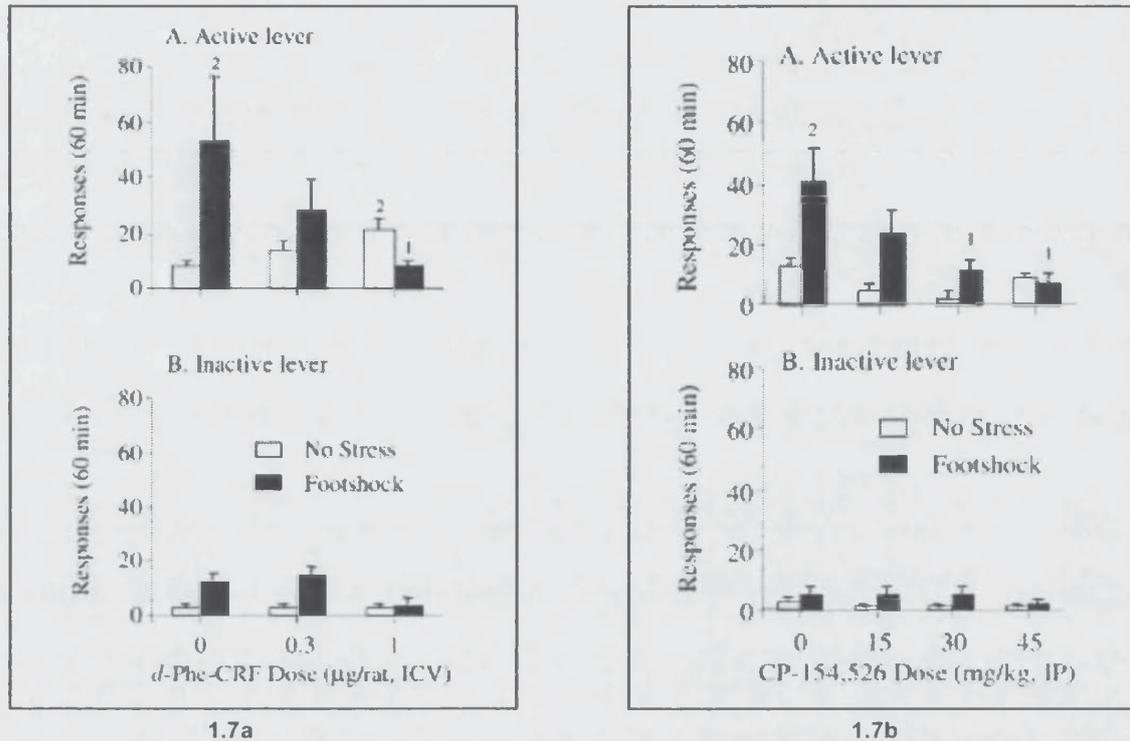


Figura 1.7. Representación gráfica en la que se muestra por una parte, el efecto del antagonista no selectivo de CRF, d-phe-CRF (**figura 1.7a**) sobre la reanudación del consumo de alcohol inducido por estrés, y por otra parte el efecto del antagonista selectivo de CRF1, CP-154-526 (**figura 1.7b**), sobre la reanudación del consumo de alcohol en ratas dependientes mediante presión de palanca en cámara de condicionamiento operante.

Las ratas fueron previamente entrenadas para auto administrarse alcohol durante 30 días en cámaras de condicionamiento operante provistas de dos palancas (una de ellas activa, cuya presión producía la liberación de 0.19 ml, 12% p/v de una solución de alcohol durante 5 segundos). Las sesiones de entrenamiento tenían una duración de 6 minutos/día, 5-7 días a la semana.

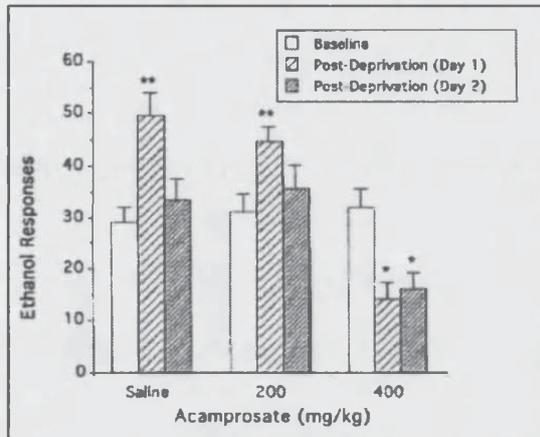
En el experimento que muestra la **figura 1.7a**, las ratas se dividieron en 3 grupos experimentales (n=9). Los animales recibieron una inyección de salino (grupo control), 0.3 µg/rata y 1 µg/rata ICV de antagonista (respectivamente, dos grupos experimentales). Cada grupo a su vez disponía de un subgrupo control, con los mismos tratamientos experimentales, pero sin someterlos a descargas eléctricas en las patas (barras blancas en cada caso), mientras que los subgrupos experimentales recibieron una sesión de 10 minutos de descargas eléctricas en las patas justo antes del comienzo del test de reanudación. Los resultados detectaron un claro efecto dosis dependiente sobre el número de veces que el animal presiona la palanca, y por tanto, sobre la reanudación del consumo de alcohol. (1) Indica diferencias significativas frente a los animales tratados con salino, pero que recibieron descargas eléctricas en las patas (barra negra, primer grupo). (2) Indica diferencias significativas frente a los animales que recibieron dosis de salino y no recibieron descargas eléctricas en las patas (barra blanca, primer grupo).

En el experimento que muestra la **figura 1.7b**, Las ratas se dividieron en 4 grupos experimentales (n=13). Los animales recibieron una inyección de salino (grupo control), 15 mg/kg, 30 mg/kg y 45 mg/kg i.p. de antagonista (respectivamente, tres grupos experimentales). Cada grupo a su vez disponía de un subgrupo control, con los mismos tratamientos experimentales, pero sin someterlos a descargas eléctricas en las patas (barras blancas en cada caso), mientras que los subgrupos experimentales recibieron una sesión de 10 minutos de descargas eléctricas en las patas justo antes del comienzo del test de reanudación.

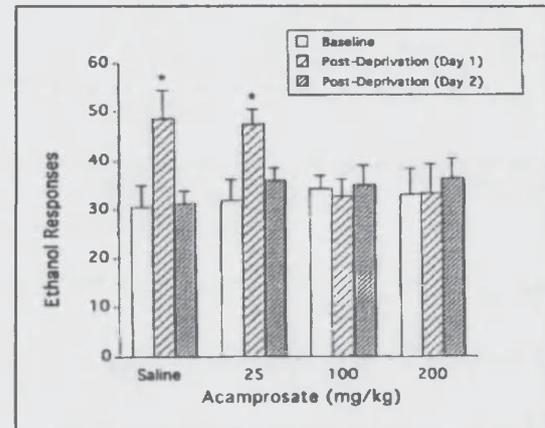
Los resultados detectaron un claro efecto dosis dependiente sobre el número de veces que el animal presiona la palanca, y por tanto, sobre la reanudación del consumo de alcohol. (1) Indica diferencias significativas frente a los animales tratados con salino, pero que recibieron descargas eléctricas en las patas (barra negra, primer grupo). (2) Indica diferencias significativas frente a los animales que recibieron dosis de salino y no recibieron descargas eléctricas en las patas (barra blanca, primer grupo). Figura tomada de Lê et al, 2000.

1.2.4.4. Acamprosato.

El acamprosato fue introducido en terapéutica en Europa en el año 1995 y en USA en 2004, por sus pretendidas acciones anticraving y preventiva de las recaídas en el consumo de alcohol, demostradas en diversos ensayos clínicos (Sass et al, 1996; Whitworth et al, 1996, aunque ver Chick et al, 2000; Mason, 2001). La investigación preclínica también ha examinado su efectividad empleando el ADE como modelo experimental. Holter y cols en 1997 demostraron que el acamprosato reduce el ADE cuando se administra por vía i.p. a las dosis de 200 y 400 mg/kg. Heyser et al en 1998 también mostraron una supresión del ADE tras la administración aguda de 400 mg/kg i.p. Dos dosis diarias de 100 y 200 mg/kg i.p. durante 5 días también fueron capaces de suprimir el ADE (Figura 1.8)



1.8a



1.8b

Figura 1.8. Representación gráfica donde se muestra el efecto de la administración aguda de acamprosato a dos dosis diferentes (200 y 400 mg/kg i.p.) (**Figura 1.8 a**) sobre el consumo de alcohol (número de veces que el animal presiona la palanca) tras un periodo de abstinencia forzada y el efecto de la administración crónica de acamprosato a tres dosis diferentes (25, 100 y 200 mg/kg i.p.) (**Figura 1.8 b**) en las mismas condiciones que el tratamiento agudo. Todos los animales fueron entrenados para consumir alcohol en sesiones diarias de 30 minutos en cámaras de condicionamiento operante provistas de dos palancas, una de ellas activa. La concentración de alcohol a la que tenían acceso las ratas se fue aumentando progresivamente durante el primer mes de entrenamiento hasta un 10% p/v, mientras que en el segundo mes de entrenamiento se consiguió que las ratas tuvieran un consumo estable de alcohol. Después del periodo de entrenamiento, los animales fueron sometidos a un periodo de abstinencia forzada de alcohol de 5 días y al día siguiente comenzó el ensayo.

En el experimento que muestra la **figura 1.8 a**, los animales se dividieron en 3 grupos experimentales (n=8). A los animales del primer grupo (control) se administró salino i.p. 30 minutos antes de comenzar el test. A los animales de los grupos experimentales se les administró acamprosato 200 y 400 mg/kg respectivamente, también 30 minutos antes del comienzo del test. Los resultados mostraron que sólo la dosis de 400 mg/kg fue capaz de reducir el ADE durante los dos días siguientes al periodo de abstinencia. (*) Indica disminución significativa del consumo de alcohol respecto al consumo basal (justo antes del periodo de abstinencia). (**) Indica aumento significativo del consumo de alcohol respecto al consumo basal tras el periodo de privación.

En el experimento que muestra la **figura 1.8 b**, los animales se dividieron en tres grupos (uno control y tres experimentales). Los animales del grupo control recibieron salino i.p. y los animales de los tres grupos experimentales recibieron acamprosato 25, 100 y 200 mg/kg respectivamente. El tratamiento en todos los casos consistió en dos inyecciones i.p. separadas 12 horas en el tiempo, durante los 5 días que duró el periodo de abstinencia. El test comenzó 30 minutos después de la última inyección de acamprosato. Los resultados mostraron que a dosis 25 mg/kg, el acamprosato no fue capaz de prevenir el ADE, mientras que fue efectivo a 100 y 200 mg/kg durante los dos días siguientes al periodo de abstinencia. (*) Indica aumento significativo del consumo de alcohol frente al consumo basal de alcohol (justo antes de la privación). Figuras tomadas de Heyser et al, 1998.

El mecanismo de acción a través del cual el acamprosato ejerce sus acciones es todavía objeto de debate, y es en este contexto en el que se desarrolla la presente Memoria. Como se detalla en los epígrafes que siguen, existen diversas teorías acerca del mecanismo de acción de este fármaco, aunque como veremos e intentaremos mostrar con nuestros experimentos, muy probablemente el acamprosato ejerza sus efectos a través de la interacción con los receptores de tipo NMDA para el Glu.

1.3. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACAMPROSATO

A pesar de la eficacia demostrada del acamprosato para reducir el consumo de alcohol y prevenir las recaídas en humanos y modelos animales de alcoholismo, el mecanismo de acción de este fármaco no es conocido con seguridad. Durante los últimos años algunos autores han abordado el estudio de este problema mediante distintas metodologías.

Los estudios iniciales postularon que el acamprosato podría interaccionar con el SNC a través de la activación de la neurotransmisión gabaérgica (Daoust et al, 1987, 1992), aunque hoy en día esta hipótesis ha sido descartada. El acamprosato no parece afectar la transmisión mediada por los receptores GABA_A. Estudios in vitro han demostrado que el acamprosato, ni actúa sobre los receptores GABA_A, ni interfiere en la corriente de iones cloruro generada por la activación de estos receptores (Zeise et al, 1993; Berton et al, 1998).

Aproximadamente desde 1997, los investigadores han centrado sus estudios en cuatro posibles mecanismos de acción:

- Interacción del acamprosato con los receptores iGlu del tipo NMDA.
- Bloqueo de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje.
- Inducción de cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA.
- Interacción con los receptores mGlu del grupo I, subtipo mGluR5.

A continuación revisaremos en lo posible las pruebas existentes a favor o en contra de estas posibilidades.

1.3.1. Interacción con los receptores NMDA

La posible interacción del acamprosato con los receptores NMDA ha sido estudiada desde múltiples puntos de vista y empleando tanto técnicas in vitro como in vivo. En general, hay un cierto consenso sobre la existencia de una interacción del acamprosato con estos receptores, aunque, obviamente, existen grupos de trabajo que discrepan. En cualquier caso, no se sabe con certeza, sin embargo, de qué manera podría actuar el fármaco con el receptor, ni si es capaz de activar o bloquear la función del receptor. Probablemente, tal y como sugirió Allgaier et al (2000), los efectos del acamprosato sobre la función de los receptores NMDA varían en función de la diferente expresión de las subunidades del receptor en las distintas regiones del cerebro. Zeise et al (1993) demostró mediante técnicas in vitro y experimentos electrofisiológicos in vivo que el acamprosato es capaz de reducir la activación de las sinapsis controladas por L-Glu en neocortex de rata. Estos autores mostraron por primera vez

que el acamprosato reducía, significativamente y de manera reversible, las respuestas despolarizantes inducidas por varios aminoácidos excitatorios como L-Glu y el propio NMDA.

Desde la publicación de ese artículo, varios autores han centrado su atención en ese dato, y en ocasiones con resultados contrarios. Así, Berton et al (1998) mostró, por medio de técnicas electrofisiológicas, que el acamprosato aumenta, más que inhibe, la neurotransmisión mediada por NMDA en NAc.

Por medio de técnicas in vitro basadas en el estudio de la unión a los receptores (Al-Qatari et al, 1998; Naassila et al, 1998) otros autores sugirieron que el acamprosato es capaz de interactuar alostéricamente, a través del lugar de unión para las poliaminas, con el receptor NMDA (ver **Figura 1.9**).

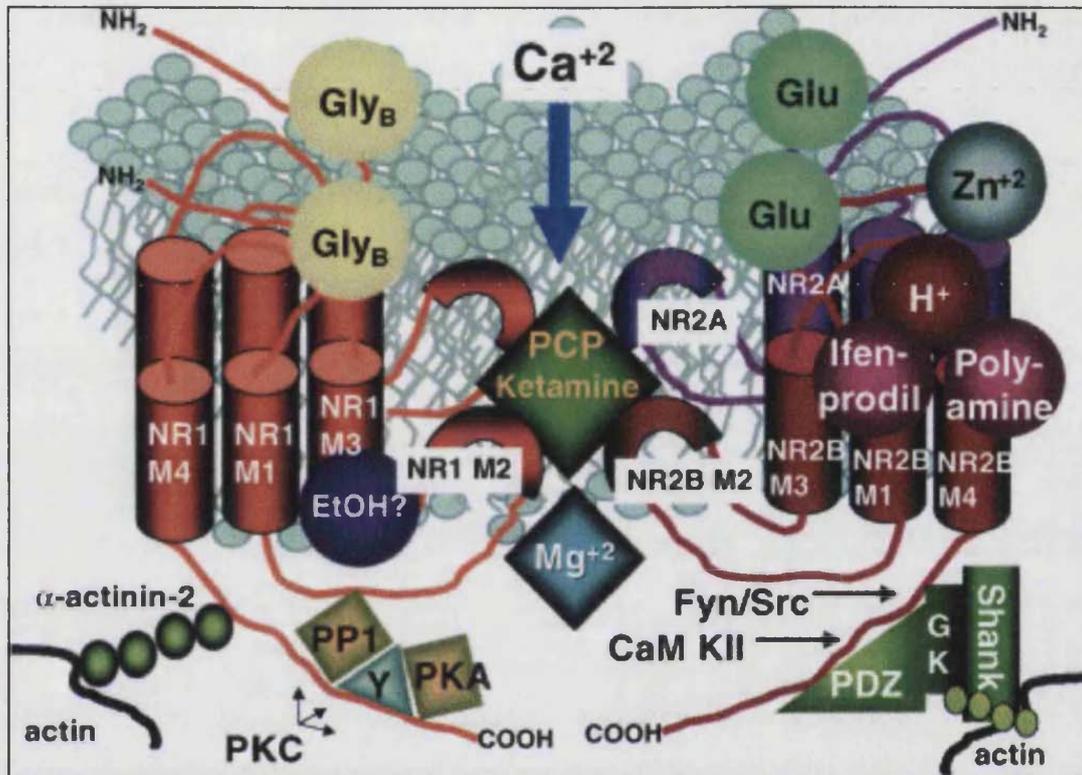


Figura 1.9. Esquema de la estructura del receptor NMDA donde se muestran los posibles sitios de unión de diversos ligandos. Según estudios de Al-Qatari et al (1998) y Naassila et al (1998), el acamprosato probablemente se uniría al mismo sitio de unión que las poliaminas, localizado en M4, uno de los 3 dominios transmembrana que posee la subunidad NMDA-R2B (NR2B) del receptor (M1, M3 y M4). El dominio M2 forma una curvatura orientada hacia la cara citoplasmática. Figura tomada de Krystal et al, 2003.

En su opinión, el efecto del acamprosato es compatible con una acción agonista parcial sobre los receptores NMDA, es decir, el acamprosato podría tener tanto efecto excitatorio como inhibitorio dependiendo de su concentración y del nivel de activación de ese receptor en concreto.

La interacción del acamprosato con el receptor NMDA también se ha estudiado mediante otras técnicas *in vitro*. Así, Allgaier et al (2000) estudió el efecto del acamprosato sobre el flujo de Ca²⁺ que provoca el NMDA en cultivos de células neuronales, y postuló que el acamprosato podría inhibir el flujo de iones Ca²⁺ a través, tanto de los receptores NMDA como de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje.

De forma similar, Al-Qatari (2001) mostró que el acamprosato inhibía la entrada de Ca^{+2} inducida por Glu en cultivos de células neocorticales, sin afectar la toxicidad del Glu.

Curiosamente, cuando los cultivos celulares se exponían previamente a etanol, el acamprosato bloqueaba de forma concentración-dependiente, no sólo la entrada de Ca^{+2} inducida por Glu, sino también la consecuente neurotoxicidad. Los autores concluyeron que aunque es improbable que el acamprosato actúe a través del mismo lugar de unión que el Glu o directamente sobre el canal de Ca^{+2} , este fármaco puede ejercer su acción inhibitoria sobre la función del receptor NMDA a través de otros lugares de unión. De hecho, Mayer et al (2002) mostraron que el acamprosato interacciona con un lugar del receptor NMDA que es activado por poliaminas tales como espermina y espermidina. En sus experimentos, el acamprosato redujo la neurotoxicidad causada por la espermidina y la entrada de Ca^{+2} en cultivos tratados con etanol (que después se había retirado) de neuronas procedentes de Hip de rata, pero fue inefectivo contra la toxicidad inducida por NMDA y la entrada de Ca^{+2} . Otros estudios neuroquímicos también sugieren la existencia de una interacción entre el acamprosato y el receptor NMDA. Así, bastantes estudios muestran que el síndrome de abstinencia producido por alcohol esta asociado a un aumento en los niveles de Glu extracelular en NAc (Dahchour et al, 1998; Melendez et al, 2005). Curiosamente, el acamprosato, no sólo reduce ese aumento de Glu durante la abstinencia, sino que además es capaz de reducir la hiperactivación que se da durante el síndrome de abstinencia (Dahchour and DeWitte, 2003) de manera similar a lo observado con otros antagonistas NMDA reconocidos (Ripley and Little, 1995). Además, la hiperexcitabilidad neuronal durante el estado de abstinencia está acompañada por un incremento en la expresión de

cFos (Knapp et al, 1998; Borlikova et al, 2006). El acamprosato pudo suprimir la expresión de cFos en varias estructuras cerebrales tales como Hip y NAc (Putzke et al, 1996).

Todo este conjunto de datos, sugiere que el acamprosato podría actuar reduciendo la neurotransmisión glutamatérgica. En estos momentos, aun no está del todo claro si este efecto se debe a una interacción con el sitio de unión a las poliaminas o con otro lugar en el receptor de tipo NMDA.

1.3.2. Bloqueo de los canales de Calcio dependientes de voltaje.

Además de la interacción descrita anteriormente con los receptores NMDA, se ha propuesto que el acamprosato podría bloquear los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Spanagel and Zieglgänsberger, 1997; Dahchour et al, 1998). A este efecto se le podría atribuir la reducción de la hiperexcitabilidad neuronal causada por acamprosato durante el síndrome de abstinencia.

Inicialmente se mostró que el acamprosato desplazaba a los antagonistas del canal del Ca^{+2} desde un lugar de unión de poca afinidad y que inhibía la sobreactivación del canal de Ca^{+2} en ratas con síndrome de abstinencia (Al-Qatari et al, 2001). Allgaier et al (2000) demostraron que en cultivos de neuronas mesencefálicas, el acamprosato era capaz de antagonizar el aumento de Ca^{+2} intracelular provocado por K^{+} de forma concentración dependiente. Los resultados obtenidos por estos autores muestran claramente que el acamprosato reduce significativamente la concentración de Ca^{+2} intracelular (**Figura 1.10**) provocada por la infusión de dos sustancias, por un lado, el agonista puro NMDA, y por otro, el anteriormente mencionado ión K^{+} .

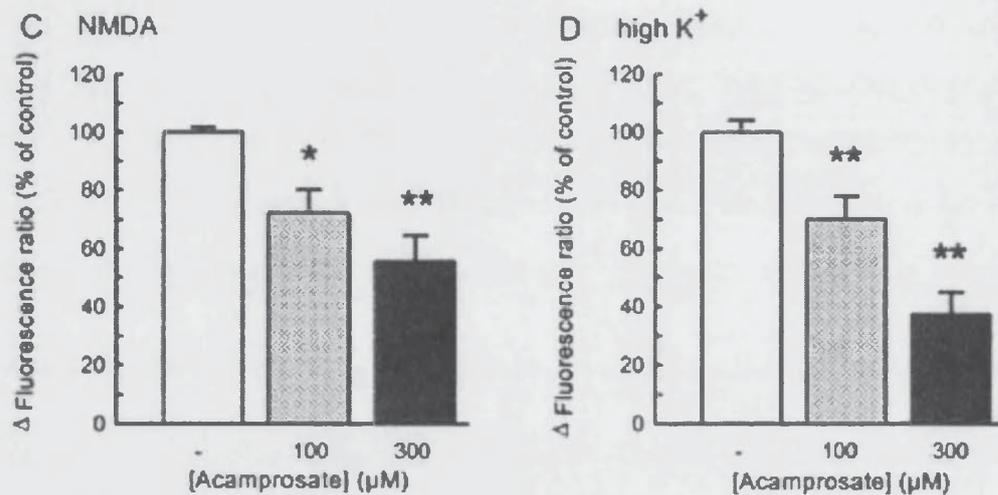


Figura 1.10. Efecto del acamprosato sobre la concentración de Ca^{+2} intracelular en cultivos neuronales. Los cultivos se prepararon a partir de células de tejido mesencefálico ventral en embriones de 14 días de gestación, donde se conoce que el 90% de sus células son de naturaleza dopaminérgica. Los cultivos fueron sometidos a una estimulación mediante dos procedimientos distintos: infusión de 100 μM de NMDA acompañado de 10 μM de Gly (C, en la figura), y por otro lado 44mM de $[\text{K}^+]$ (D, en la figura) durante 1 minuto. Ambas estimulaciones produjeron aumento en la concentración de Ca^{+2} intracelular y se pudo demostrar que ese aumento disminuía al cabo de 5 minutos, y era completamente reproducible pasados 15 minutos. El acamprosato se aplicó 10 minutos antes y durante la segunda y tercera estimulación a la concentración de 100 y 300 μM respectivamente. Como se observa en la figura, el acamprosato redujo la entrada de Ca^{+2} (medida como un incremento de la fluorescencia respecto al control) producida por ambos estimulantes. La disminución fue del 28% y 45% a la concentración de 100 y 300 μM cuando la estimulación fue causada por NMDA, y de un 30% y 62% respectivamente cuando el estímulo fue provocado por $[\text{K}^+]$. (*) Indica diferencias significativas respecto al control para $p < 0.05$. (**) Indica diferencias significativas respecto al control para $p < 0.01$. Figura tomada de Allgaier et al, (2000).

1.3.3. Cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA

En el 2001, Rammes y cols demostraron que el tratamiento agudo con acamprosato (al igual que con antagonistas NMDA reconocidos, tales como memantine y MK-801) aumentaba la expresión de algunas subunidades específicas del receptor NMDA en áreas concretas del cerebro. Este fenómeno podría constituir una nueva y novedosa explicación del mecanismo de acción del acamprosato.

La regulación de la expresión fue detectada en PFC e Hip mientras que en tallo cerebral no se observaron cambios. En PFC, los cambios en la expresión se detectaron después de una única dosis i.p. de acamprosato de 200mg/kg. Estos cambios afectaron principalmente a las subunidades NR1-3/1-4 y NR2B. Cuando se inyectaron i.p. dos dosis de 200 mg/Kg de acamprosato, separadas por un intervalo de tiempo de 12 horas, se observó un incremento de la expresión de todas las subunidades que se estudiaron (NR1-1/1-2, NR1-3/1-4 y NR2B) en Hip.

Estos resultados muestran claramente que la expresión de subunidades del receptor NMDA puede ser rápidamente aumentada por el tratamiento con acamprosato aunque este fenómeno depende de la región del cerebro que se estudie. Teniendo en cuenta que cambios en la composición de subunidades del receptor NMDA pueden inducir fuertes cambios en las características funcionales del receptor en las áreas afectadas (Vicini et al, 1998; Cull-Candy et al, 2001), el hallazgo de Rammes y su grupo investigador, podría constituir una explicación novedosa del mecanismo de acción de este fármaco. A pesar de la importancia del hallazgo, en nuestra opinión, son necesarios muchos más experimentos para poder caracterizar convenientemente las consecuencias neurológicas de estos cambios sobre la transcripción de

las subunidades del receptor NMDA. En especial, es crucial analizar cuáles son las consecuencias que un tratamiento crónico con acamprosato (puesto que los tratamientos en humanos no son de tipo agudo como los analizados por Rammes y cols, sino crónicos) tiene sobre la expresión de las distintas subunidades del receptor NMDA y, por tanto, sobre su funcionalidad. En la presente Memoria hemos iniciado estos estudios tal y como se detallará a continuación.

1.3.4. Interacción del acamprosato con los receptores metabotrópicos grupo mGluR5.

En el año 2002, se propuso una nueva hipótesis sobre el posible mecanismo de acción del acamprosato (Harris et al, 2002). De acuerdo con esta hipótesis, el acamprosato podría ejercer su efecto a través de interacciones con receptores mGlu grupo I, en concreto, con el subtipo 5 (mGluR5). Este grupo investigador encontró que el acamprosato inhibe competitivamente la unión del t-ACPD (trans-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid, un conocido agonista de los receptores mGlu de los grupos I y II) en las preparaciones in vitro. Según estos autores, el acamprosato competiría por los mismos lugares de unión a ligandos que el t-ACPD, sin desplazar al Glu en su sitio de unión.

Además, según estos autores, el acamprosato podría actuar como neuroprotector contra la neurotoxicidad producida por el t-ACPD en cortes cerebrales de la región del Hip. Debido a que los antagonistas de los receptores mGlu del grupo I son en general neuroprotectores (Nicoletti et al, 1999), estos autores sugirieron que la capacidad del acamprosato para modular la transmisión glutamatérgica, podría ser debida, al menos en parte, por el efecto del acamprosato sobre el receptor mGlu, más que por una acción directa sobre los iGlu. Por tanto, esta acción del

acamprosato sobre los receptores mGluR5 también proporcionaría una explicación mucho más satisfactoria según ellos, a los efectos neuroprotectores de este fármaco. Estos autores demostraron en sus experimentos que la activación del receptor mGluR5 por t-ACPD causa excitotoxicidad y muerte celular en las células de Hip, debido a la excesiva liberación de Glu. Este efecto podría ser bloqueado por un lado por el SIB-1893, un antagonista selectivo del receptor mGluR5, y por otro lado por el MK-801, un conocido antagonista NMDA. La explicación para este fenómeno fue que el t-ACPD activaría los receptores mGluR5 a nivel presináptico, estimulando la liberación de Glu, que a su vez activaría los receptores NMDA postsinápticos de las neuronas (en este caso, las CA1 de Hip), originando la muerte celular producida por sobreactivación. El acamprosato, según los estudios de Harris y cols (2002) bloquearía los efectos citotóxicos del t-ACPD, al igual que protegería contra la muerte celular durante el periodo de abstinencia, en el que se sabe que existe hiperexcitabilidad neuronal y por tanto la posibilidad de citotoxicidad producida por un aumento en la liberación de Glu. Una acción antagonista del acamprosato a nivel de receptores presinápticos mGluR5 explicaría satisfactoriamente los efectos neuroprotectores del acamprosato tanto en el estado de abstinencia como en la liberación masiva de aminoácidos excitatorios endógenos.

Esta hipótesis ha sido recientemente rebatida. Reilly y cols (2008) afirman que el acamprosato no actuaría sobre los receptores mGlu del grupo I. Mediante la realización de experimentos de electrofisiología en oocitos de xenopus, midieron la actividad de dichos receptores en presencia de una concentración de acamprosato de 1-100 μm , concentración que ellos consideraron fisiológica, y encontraron que el acamprosato a dicha concentración no alteraba la función de estos receptores. También habría que tener en cuenta que, recientemente, otro grupo investigador ha

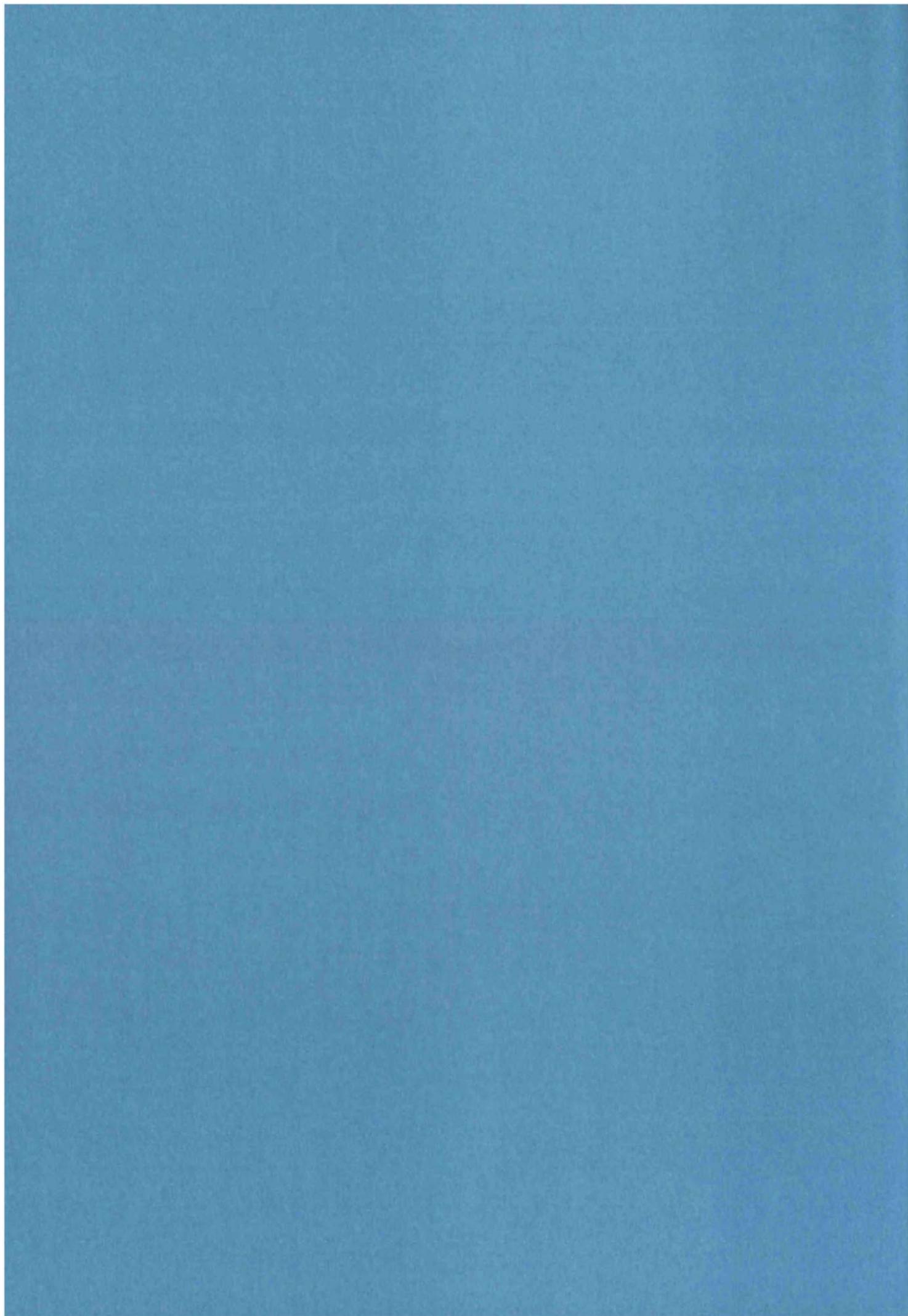
indicado que los receptores mGlu del grupo I, raramente se encuentran a nivel presináptico (Gass and Olive, 2008).

1.4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO:

El objetivo principal del presente trabajo es aportar datos que permitan la caracterización del mecanismo de acción del acamprosato. Para ello, y partiendo de la hipótesis, sustentada por trabajos previos de distintos autores, de que el acamprosato podría ejercer sus efectos a través de la interacción con los receptores iGlu del tipo NMDA, se han diseñado una serie de experimentos encaminados a conseguir los siguientes objetivos:

- 1- analizar si el acamprosato interacciona con los receptores del tipo NMDA localizados en NAc y VTA con objeto de dilucidar sus efectos sobre los niveles extracelulares de DA en el NAc que, como sabemos, son determinantes en algunos aspectos de la recaída en el consumo de alcohol y otras drogas de abuso
- 2- analizar si el acamprosato se comporta como agonista parcial o antagonista de los receptores NMDA
- 3- determinar los efectos que los tratamientos (agudos, y sobre todo crónicos) que emplean acamprosato, tienen sobre la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA en tres regiones del cerebro con importancia en las recaídas en el consumo de drogas: NAc, PFC y vHip.

*Capítulo 2:
Materiales y
Métodos*



2.1 EXPERIMENTOS DE MICRODIÁLISIS:

2.1.1. Soluciones de trabajo y compuestos utilizados

2.1.1.1 Solución de fluido cerebroespinal artificial (aCSF)

Todos los experimentos de microdiálisis in vivo se realizaron empleando solución aCSF con la siguiente composición:

Compuesto	Concentración	
	g/l	mM
NaCl	8.67	147
KCl	0.224	3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.191	1.3
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.203	1
Na(H ₂ PO ₄)	0.1	0.6
Na ₂ (HPO ₄)	0.2	0.6

El pH se ajustó siempre a un valor de 7.4. En este medio se disolvieron, a la concentración adecuada, los diferentes compuestos empleados en los experimentos.

2.1.1.2. Acamprosato

El acamprosato o bis-acetilhomotaurinato cálcico (suministrado directamente por el laboratorio LIPHA S.A), es el fármaco objeto de estudio de la presente Memoria. Su estructura química aparece a continuación (**Fig.2.1**)

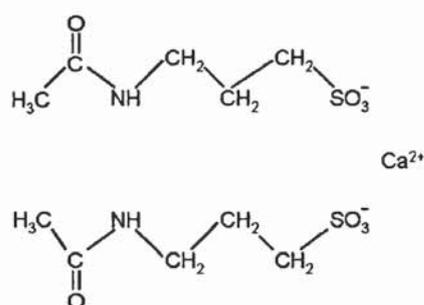


Fig 2.1 Estructura química del acamprosato o bis-acetilhomotaurinato cálcico

Es un polvo blanco, inodoro y de sabor amargo. Es muy soluble en agua y en la mayoría de fluidos biológicos (Faus et al, 1996). En disolución acuosa se encuentra totalmente disociado (98%) originando dos moléculas de acetyl homotaurinato y un ión de Ca^{+2} . Sus disoluciones acuosas presentan un pH que varía entre 5.5 y 7. Los ensayos potenciométricos realizados confirmaron que el acetilhomotaurinato cálcico es una base débil, de lo que se deduce que su ácido conjugado, el ácido acetyl homotaurínico es un ácido fuerte (Chabenat et al, 1988). Estos mismos autores investigaron la estabilidad del fármaco en distintos medios, concluyendo que el acamprosato es un fármaco de elevada estabilidad química, por lo que parece improbable que, *in vivo*, actúe como precursor del aminoácido homotaurina (metabolito más probable).

Para la perfusión de acamprosato en las áreas cerebrales objeto de estudio, se preparó una solución madre en agua a una concentración de 200mM que se conservó en nevera y a partir de ésta, se obtuvieron diluciones en aCSF de 0.05, 0.1, 0.5 y 5 mM en función del experimento.

Además del acamprosato, para el desarrollo de los distintos experimentos incluidos en este trabajo, se emplearon otras sustancias que se relacionan a continuación.

2.1.1.3 Ácido N-metil-D-aspártico (NMDA)

El NMDA es un aminoácido sintético que actúa como agonista puro del receptor NMDA para glutamato. Es un polvo blanco soluble en agua y fue suministrado por Tocris Cookson. (Bristol, U.K.). Su estructura química se muestra a continuación (**Fig 2.2**)

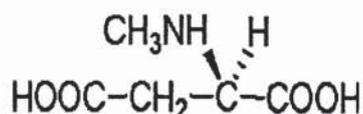


Fig 2.2 Estructura química del NMDA

Se preparó inicialmente una solución en aCSF de concentración 50 mM y se congelaron alícuotas de esta solución de aproximadamente 300µl. Para la realización de cada experimento, se realizaron diluciones posteriores en aCSF hasta la concentración de 0.025, 0.5 y 5 mM que fueron las utilizadas en los experimentos.

2.1.1.4. Ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC)

El PDC es un compuesto capaz de bloquear la recaptación intraneuronal del glutamato endógeno. En su forma cristalina, fue suministrado por Sigma[®] Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.). Su estructura química se muestra a continuación (**Fig 2.3**)

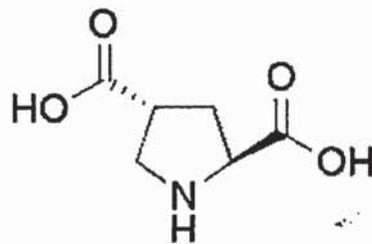


Fig 2.3. Estructura química del PDC

Para la perfusión de PDC en NAc se preparó una solución en aCSF a la concentración de 0.5 mM a partir de una solución madre preparada en agua a una concentración de 10 mM y congelada en alícuotas de 200 μ l.

2.1.1.5. Ácido DL- 2- amino-5- fosfopentanoico (AP5)

El AP5 es un antagonista selectivo de los receptores NMDA. En su forma cristalina, fue suministrado por Sigma[®] Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.). Su estructura química se muestra a continuación (**Fig 2.4**)

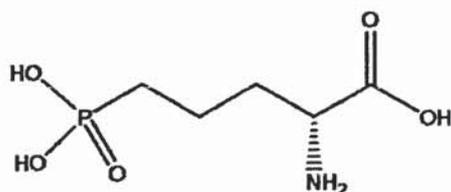


Fig 2.4 Estructura química del AP5

Para la perfusión de AP5 en NAc se preparó una solución en aCSF de concentración 0.4mM a partir de una solución madre de concentración 1mM de la cual se congelaron alícuotas de 2.5 ml para su posterior utilización.

2.1.1.6. Baclofen

El baclofen es un agonista de los receptores GABA_B. En su forma cristalina, fue suministrado por Sigma[®] Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.). Su estructura química se muestra a continuación (**Fig 2.5**)

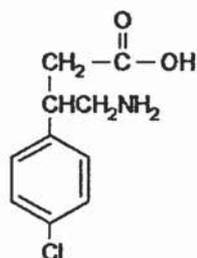


Fig 2.5 Estructura química del baclofen

Para la perfusión de baclofen en VTA, se preparó una solución madre en agua a la concentración de 10 mM. Esta disolución se renovó semanalmente y se conservó en nevera. A partir de ella, se prepararon en el momento de su uso diluciones en aCSF a la concentración de 0.05 mM.

2.1.2. Animales de experimentación

El animal de experimentación empleado para la realización de este trabajo ha sido la rata albina macho de raza Wistar. En los ensayos de microdiálisis se emplearon animales de peso comprendido entre 300-330g.

Todos los animales se criaron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universitat de València, situado en la Facultat de Farmàcia, y se mantuvieron con una dieta sólida estándar en perfectas condiciones higiénicas y climáticas:

- Temperatura: 23 ± 1 °C
- Humedad: 60%
- Ciclos de luz y oscuridad: 12-12 horas (Conexión de 8:00 a 20:00)

Tras la estereotaxia, y previamente a la realización de los experimentos de microdiálisis, todos los animales se mantuvieron individualmente en jaulas cilíndricas de metacrilato (50 cm alto x 20 cm diámetro) con acceso libre a comida y agua de bebida durante 24-48 horas. (Protocolo aprobado por el Comité Ético a través de los proyectos de investigación).

2.1.3. Sondas de microdiálisis

La microdiálisis es una técnica experimental que permite el muestreo continuo de sustancias endógenas y la administración localizada de sustancias exógenas en el SNC a través de una sonda con una membrana de diálisis permeable al agua y a algunos solutos (Cano-Cebrián et al, 2005). Dicha sonda separa dos compartimentos acuosos: el agua extracelular tisular y el líquido perfundido (solución aCSF) que se hace circular a una velocidad perfectamente conocida y constante por el interior de la membrana. En la figura siguiente se ilustra un esquema que nos puede ayudar a interpretar más fácilmente esta idea (**Figura 2.6**).

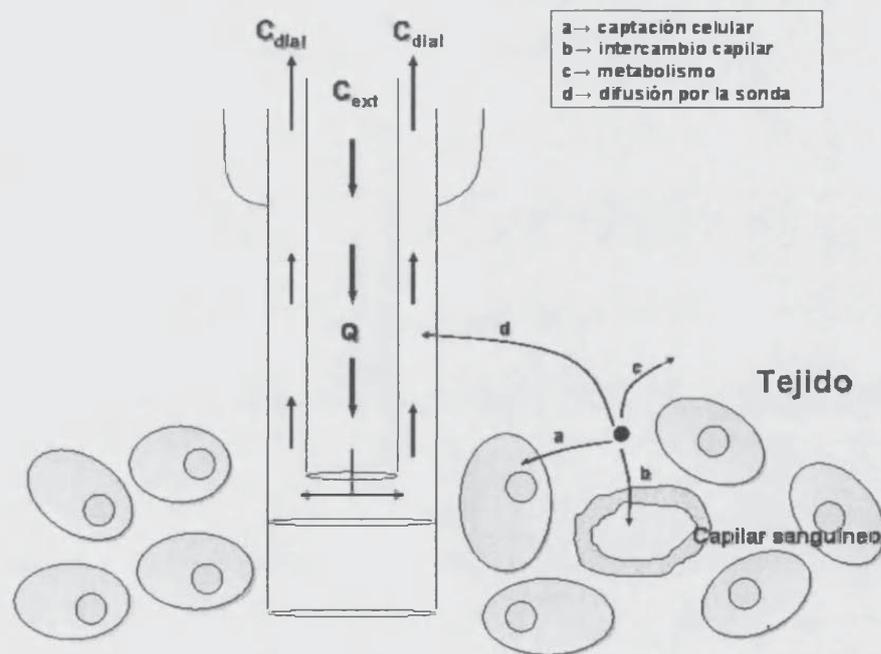


Figura 2.6 Representación esquemática de una sonda de microdiálisis implantada en un tejido sólido. Las vías de difusión y eliminación de un fármaco hipotético también se muestran en el dibujo. En nuestro caso particular, se perfundió el compuesto de ensayo a una determinada concentración (C_{ext}) y en el dializado se cuantificaron los niveles de una sustancia endógena, la dopamina (C_{dial}), siendo Q el flujo de perfusión empleado.

Se utilizaron sondas de microdiálisis de tipo concéntrico en forma de "Y" elaboradas por nosotros mismos, de acuerdo con la metodología propuesta por Santiago and Westerink (1990). En su construcción se emplearon los siguientes materiales:

- Membranas de diálisis: Se utilizaron membranas de poliacrilonitrilo obtenidas a partir de hemofiltros de tubos capilares comerciales Hospal® (AN69). Sus diámetros son de 220µm el interno y 300 µm el externo.
- Tubo de Sílice: sus dimensiones son 150 µm de diámetro externo y 75 µm de diámetro interno.
- Tubo de polietileno: se utilizó tubo de polietileno (Portex limited, England) no estéril de diámetro externo 1,09 mm y diámetro interno 0,38 mm.
- Aguja: Se emplearon agujas de 25 G y 20 mm de longitud.
- Adhesivo de silicona, pegamento rápido de contacto y resina epoxi rápida.

Para el montaje de la sonda se procede del siguiente modo: a un fragmento de aproximadamente 2 cm de longitud de tubo de polietileno se le practica un orificio a 0,5 cm de uno de los extremos con la ayuda de una aguja de 30G. Se introduce un fragmento de tubo de sílice adecuado de unos 2 cm de longitud a través de este orificio y se hace emerger 7 mm de longitud a través del extremo más próximo del tubo de polietileno. El conjunto así ensamblado adopta la forma "Y".

Al conjunto anterior se le fija, con ayuda de resina epoxi, un fragmento de la parte metálica de una aguja de 25 G previamente acondicionado para tal fin. (**Fig 2.7**)

Las membranas de diálisis por su parte, se preparan del siguiente modo: a un fragmento de 3-4 cm de tubo de diálisis se le obtura uno de sus extremos con resina epoxi. La operación se realiza de modo que no emerjan restos de resina. El tapón obturador así creado no debe sobrepasar 0,5 mm de longitud.

Tras el secado a temperatura ambiente de la resina se cortan los fragmentos sobrantes de la membrana de diálisis de modo que la longitud final de ésta sea igual a 9 mm.

Veinticuatro horas antes de su uso, se procede al ensamblaje de los fragmentos de las membranas de diálisis y del conjunto de polietileno-tubo sílice anteriormente citado con ayuda de un pegamento de cianocrilato (**Figura 2.7**). La membrana se cubre después con adhesivo de silicona, dejando tantos milímetros de superficie útil como se desee según el área cerebral donde se vaya a implantar la sonda. En nuestros experimentos, fueron 2 mm cuando las sondas se implantaron en NAc e vHip y 1mm cuando se implantaron en VTA.

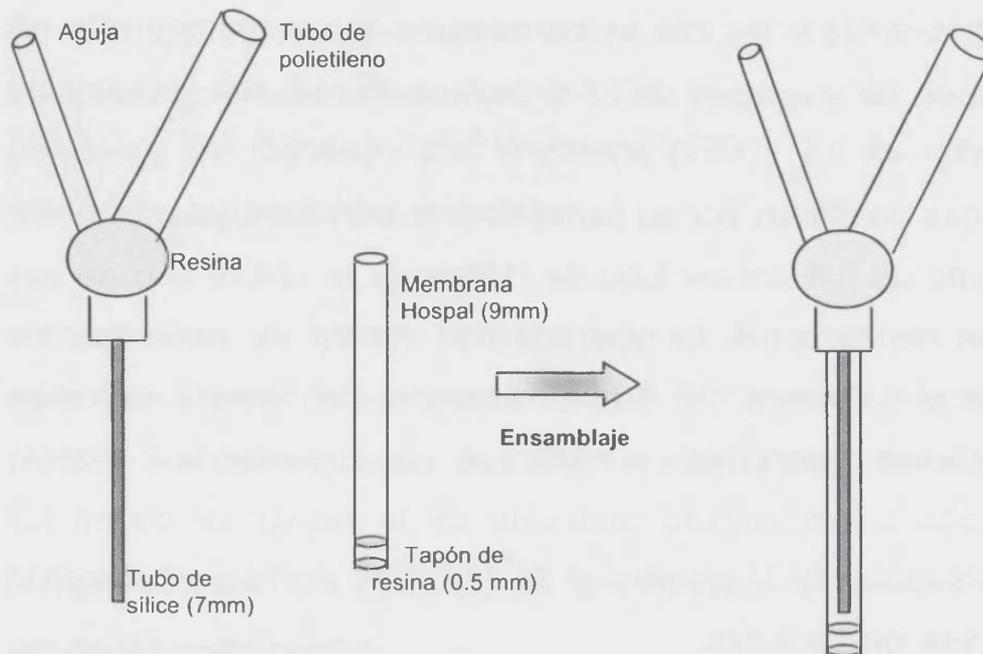


Figura 2.7 Ensamblaje de las partes de la sonda de microdiálisis.

2.1.4. Implantación de las sondas de microdiálisis.

Estereotaxia.

El proceso comenzó con la anestesia del animal, inyectándole por vía i.p. una solución de Hidrato de Cloral (400 mg/kg). A continuación se le rasuró la parte superior de la cabeza y se colocó la rata en el estereotáxico. Posteriormente, se realizó una incisión longitudinal de entre 1 y 2 cm en la parte superior de la cabeza para que quedara a la vista el cráneo del animal. Se consiguió así la visualización de los puntos **bregma** y **lambda** que sirven de referencia para posicionar la sonda correctamente. Se utilizó el Atlas de Paxinos y Watson para la

determinación de las coordenadas estereotáxicas (Paxinos and Watson, 1986).

Se practicaron 2 ó 3 orificios en el cráneo en función del experimento, uno para el tornillo de anclaje y el ó los otros dos para la implantación de la/s sonda/s.

Las coordenadas utilizadas en nuestros experimentos fueron:

- NAc: A/P: +2.0 mm, L: -1.4 mm, V: -8.3 mm.
- Hip: A/P: -5.4 mm, L: -5.3 mm, V: -9.0 mm
- VTA: A/P: -5.0 mm, L: -1.0 mm, V: -9.3 mm

Una vez implantada la/s sonda/s, se procedió a su fijación a la superficie del cráneo, usando cemento dental Rapid Repair (Dentsplay®).

Cuando endureció el cemento dental, se procedió a desinfectar la herida con povidona yodada al 10% y se suturó con ayuda de una aguja convencional e hilo de seda.

El tiempo habitual requerido para completar el proceso de implantación de la sonda de microdiálisis fue de 40-60 minutos.

2.1.5. Protocolo experimental

Los experimentos de microdiálisis se llevaron a cabo entre 24-48 horas después de la implantación de la sonda de microdiálisis y bajo la modalidad de trabajo *on line*. La sonda implantada en el animal se conectó por un lado a una jeringa Hamilton de 2.5 ml de capacidad precargada de aCSF y por otro, a una válvula de inyección Valco del cromatógrafo a través de unos conectores de polietileno, fabricados por nosotros mismos, de una longitud total de 45 cm. Con ayuda de una

bomba de perfusión Harvard Apparatus 22, y a través de los conectores unidos a la jeringa se procedió a lavar la sonda con solución aCSF a un flujo de 3.5 μ l/min durante una hora con el fin de arrastrar los restos del interior, y a continuación se conectó al HPLC para el posterior análisis del dializado.

En el momento del comienzo del experimento, la rata se encontraba completamente despierta, con libertad de movimientos dentro de la jaula y con acceso libre a comida y agua de bebida (Ver **Figura 2.8**).

Las fracciones de dializado recogidas fueron analizadas cada 20 minutos para cuantificar su contenido en DA (epígrafe 2.1.6).

Todos los experimentos comenzaron con el establecimiento del nivel basal de DA extracelular en NAc. Se consideró un nivel basal estable, adecuado para dar comienzo a los tratamientos farmacológicos, aquel que quedó constituido por los niveles de DA en cuatro dializados que no difirieron en más de un 10%. Una vez comprobada la existencia de un nivel basal estable, se dio comienzo al tratamiento correspondiente en cada experimento mediante la aplicación de la sustancia en estudio a través de la sonda de microdialisis.

Todas las sustancias utilizadas en los experimentos se disolvieron en aCSF.

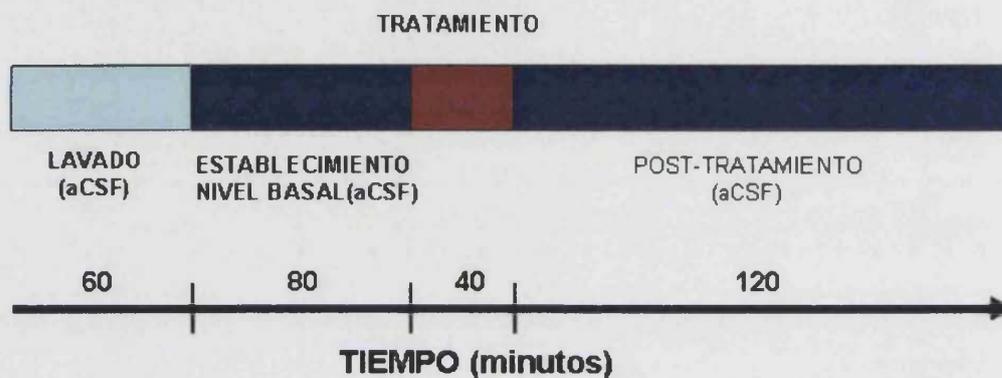


Figura 2.8. Vista del equipo empleado en los experimentos de microdiálisis

2.1.5.1. Efectos del acamprosato perfundido en NAc sobre los niveles extracelulares de DA en NAc

Para la realización de este experimento, se utilizaron tres grupos de ratas ($n=5$) que recibieron acamprosato a las concentraciones de 0.05, 0.5 y 5mM respectivamente durante 40 minutos. Durante y después del tratamiento, se cuantificaron los niveles de DA en los dializados, cada 20 minutos, hasta completar el experimento, que duró un total de 240 minutos.

En el siguiente esquema se ilustra el protocolo general de estos experimentos:



2.1.5.2. Efectos del acamprosato sobre la liberación de DA inducida por NMDA y PDC en NAc

2.1.5.2.1 Efecto del NMDA

Para evaluar el efecto del acamprosato sobre la liberación de DA inducida por NMDA, un agonista puro del receptor, se realizaron distintos experimentos perfundiendo NMDA en el NAc de la rata a diferentes concentraciones en presencia y ausencia de acamprosato.

En el primer experimento, se administró NMDA a dos grupos de animales ($n=5$). Al primer grupo de animales se les administró una solución de NMDA 0.025 mM durante 40 minutos, mientras que al segundo grupo de animales se les administró una solución de acamprosato 0.05mM durante 20 minutos seguido de una solución de acamprosato 0.05mM y NMDA 0.025 mM durante los 40 minutos posteriores. Tras la administración de

las sustancias indicadas, se perfundió aCSF hasta el final del experimento, cuya duración total fue de 240 minutos.

El segundo experimento también constaba de dos grupos experimentales (n=5). A los animales del primer grupo se les administró una solución de NMDA 0.5 mM durante 40 minutos, mientras que a los animales pertenecientes al segundo grupo experimental se les administró una solución de acamprosato 0.05mM durante 20 minutos seguido de una solución de acamprosato 0.05mM y NMDA 0.5 mM durante los 40 minutos posteriores. Tras la perfusión de las sustancias indicadas, se volvió a la perfusión de aCSF hasta el final del experimento, cuya duración total fue de 240 minutos.

2.1.5.2.2. Efecto del PDC

Para evaluar el efecto del acamprosato sobre la liberación de DA en el NAc inducida por PDC, un bloqueante de la recaptación de glutamato endógeno, se realizó un experimento que constaba de dos grupos de animales (n=5). Los animales del primer grupo recibieron una solución de PDC 0.5 mM durante 40 minutos, mientras que a los animales del segundo grupo experimental se les perfundió una solución de acamprosato 0.05mM durante 20 min seguido de una solución de acamprosato 0.05mM y PDC 0.5 mM durante los 40 minutos posteriores. Tras la perfusión de las sustancias indicadas, se volvió a la perfusión de aCSF hasta el final del experimento, cuya duración total fue de 240 minutos.

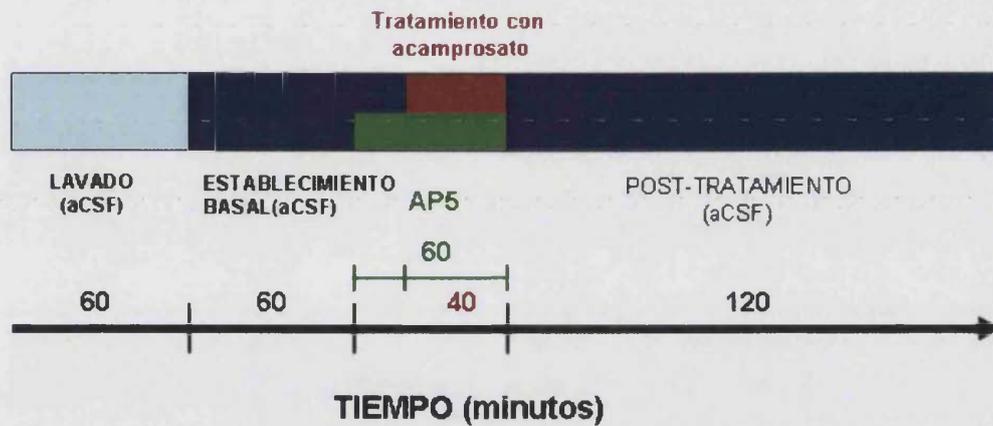
En el siguiente esquema, se ilustra el protocolo general de estos experimentos:



2.1.5.3. Efectos del AP5 sobre la liberación de DA inducida por acamprosato en NAc

Con objeto de evaluar el efecto del AP5, un antagonista selectivo de los receptores NMDA, sobre la liberación de DA inducida por acamprosato en NAc, se emplearon dos grupos de animales ($n=4-5$). A los animales del primer grupo experimental se les administró, a través de la sonda, una solución de acamprosato 0.5 mM durante 40 minutos, mientras que a los animales pertenecientes al segundo grupo experimental se les administró una solución de AP5 0.4 mM durante 20 minutos seguido de una solución de AP5 0.4mM y acamprosato 0.5mM durante los 40 minutos posteriores. Tras la perfusión de las sustancias indicadas, se volvió a perfundir aCSF hasta el final del experimento, cuya duración total fue de 240 minutos.

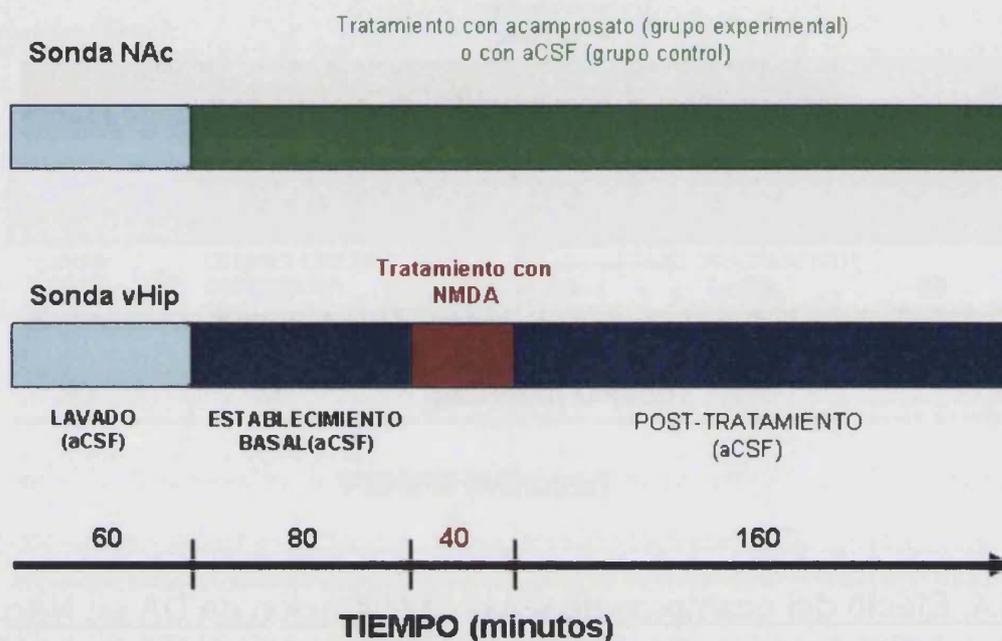
En el siguiente esquema, se ilustra el protocolo general de estos experimentos:



2.1.5.4. Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA en NAc mediada por la estimulación química del Hipocampo ventral (vHip).

Para la realización de este experimento, se utilizaron dos grupos de animales ($n=5$). A los animales de ambos grupos, se les perfundió a través de la sonda situada en vHip NMDA 5mM durante 40 minutos, mientras que simultáneamente, a través de la sonda implantada en NAc, se perfundió aCSF a los animales pertenecientes al grupo control y acamprosato 0.05mM a los animales del grupo experimental durante todo el experimento. Después del tratamiento, en vHip se perfundió solución aCSF hasta el final del experimento en total (280 minutos).

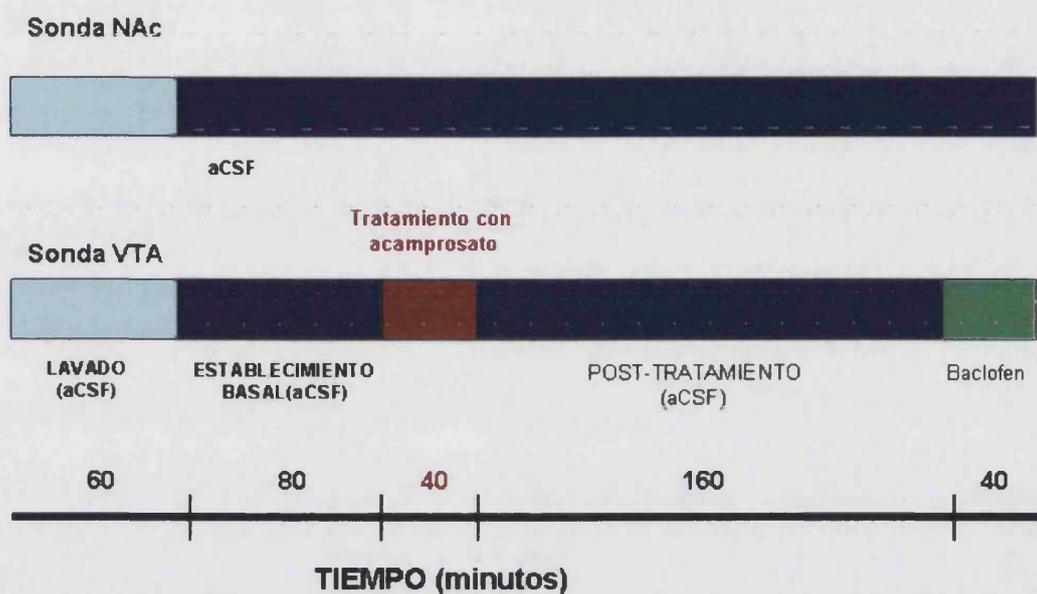
En el siguiente esquema, se ilustra el protocolo general de estos experimentos:



2.1.5.5. Efecto del acamprosato perfundido localmente en VTA sobre los niveles de DA extracelular en NAc.

Para realizar este experimento, se utilizaron 3 grupos de animales ($n=5$) a los que se les administró acamprosato mediante retrodiálisis en VTA durante 40 minutos a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 5mM respectivamente, mientras que a través de la sonda implantada en NAc se perfundió aCSF. Una vez finalizado el experimento, se perfundió una solución de baclofen 50 μ M con el fin de validar funcionalmente la correcta posición de la sonda en VTA (Westerink et al, 1996). Una disminución en la DA de NAc de aproximadamente 65% del nivel basal, se consideró indicativo de un correcto posicionamiento de la sonda en VTA.

En el siguiente esquema, se ilustra el protocolo general de estos experimentos:



2.1.6. Cuantificación de DA en los dializados

La técnica analítica empleada para la cuantificación de los niveles de DA en los dializados fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica.

El sistema cromatográfico utilizado está constituido por los siguientes elementos (ver **figura 2.8**):

- Bomba isocrática "Waters Mod. 515 "
- Válvula tipo VALCO con un volumen de inyección de 65 μ l, provista de un accionador microeléctrico
- Detector electroquímico Antec Mod. "Intro" de Antec
- Registrador-Integrador Perkin-Elmer Mod. LCI-100 (USA)

Como fase estacionaria se empleó un sistema de fase reversa constituido por una columna Novapak C-18 de "Waters" de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno y rellena de sustrato pelicular C18, cuyo tamaño de partícula es de 4 μm .

La fase móvil se preparó a partir de una solución de tampón acetato sódico (4.1 g/l) a pH= 4.1, a la que se añadió ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (0.1 g/l), ácido octanosulfónico (0.061 g/l) y metanol (7% v/v). Esta fase se filtró 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.

El flujo de elución de la fase móvil siempre fue de 0.6 ml/min, soportando el sistema una presión máxima de 1200 psi. El volumen de muestra inyectado fue de 65 μl y se ajustó el potencial de la célula a +0.550V.

El patrón de DA de concentración conocida (0.2nM) se inyectó al principio de cada experimento, con el fin de detectar cualquier cambio en el tiempo de retención de la DA, así como para cuantificar la concentración de DA en el dializado.

El límite de detección en nuestras condiciones de trabajo se situó en torno a 0.1nM.

2.1.7. Confirmación de la posición de la sonda

Una vez finalizado el experimento de microdialisis, las ratas fueron anestesiadas con Hidrato de cloral para posteriormente, perfundir, a través de la sonda de microdialisis, una solución de formaldehído al 4%

en tampón fosfato 0.1M durante 20 minutos a un flujo de perfusión de 1.5 μ l/min.

A continuación, se procedió a la extracción y congelación de los cerebros a -20°C . Los cerebros congelados se cortaron en secciones de 30 μm de espesor en un criostato, y se recogieron en portaobjetos gelatinizados para su posterior tinción mediante la técnica de Nissl utilizando como colorante el violeta de cresilo. Tras la tinción de los cortes histológicos, se procedió a la validación histológica de la sonda implantada a través de microscopía óptica.

2.1.8. Evaluación de la técnica analítica: linealidad, exactitud y reproducibilidad

Para comprobar la linealidad del método analítico dentro del ámbito de concentraciones presentes en las muestras experimentales se prepararon en aCSF cinco soluciones patrón de DA a las siguientes concentraciones: 0.2, 0.5, 1, 2 y 5 nM, y se inyectaron en el cromatógrafo. Los valores de altura obtenidos para cada patrón se representaron frente a sus correspondientes concentraciones teóricas y se sometieron a un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

Para la evaluación de la exactitud y reproducibilidad del método analítico, se prepararon cinco rectas de calibración con cinco patrones distintos, a las mismas concentraciones de DA en aCSF en cada una de ellas. Cada patrón se valoró por triplicado como si se tratase de una muestra de concentración desconocida. Los valores de concentración de DA se calcularon interpolando los valores de altura 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 reproducibilidad.

2.1.8. Análisis de los resultados y métodos estadísticos

Todos los valores de concentración de DA en los dializados fueron expresados como porcentajes del valor basal. La concentración media de las cuatro primeras muestras cuyo coeficiente de variación fuera menos del 10% fue considerada como valor basal, y definido como el 100%. El resto de valores fueron, como decimos, referidos al 100%.

Los resultados de los distintos experimentos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de dos vías (dosis ó tratamiento x tiempo).

Cuando se detectaron diferencias significativas para el factor dosis ó tratamiento o para la interacción dosis-tratamiento x tiempo, se procedió a la realización de un ANOVA de una vía entre sujetos a cada tiempo, seguido de la prueba de Scheffe, cuando procedía, para analizar la dosis ó tratamiento-dependencia.

Cuando se detectaron diferencias significativas para el factor tiempo, se analizó mediante un ANOVA intrasujetos de una vía, con medidas repetidas frente al tiempo, seguido, en caso de significación, de un análisis de comparación múltiple a través de la prueba de Dunnet. En todos los casos, el nivel de significación fue fijado en $P < 0.05$.

Para la realización de los análisis estadísticos se empleó el programa informático SPSS versión 12.0.

2.2 EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT

Estos experimentos se diseñaron con el objeto de evaluar el efecto del acamprosato, administrado por vía i.p. de forma aguda o crónica, sobre la expresión de las subunidades NR2A, NR2B y NR1 del receptor NMDA para el Glu en dos áreas cerebrales del sistema mesocorticolímbico (NAc y PFC), así como en vHip. Con este fin, se utilizó la técnica de "Western-blot". Se trata de un método potente, en el que las proteínas son separadas en primer lugar, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posteriormente se transfieren a una membrana electroforéticamente.

2.2.1 Soluciones de trabajo y anticuerpos

2.2.1.1 Tampón de lisis RIPA (Radio Immune Precipitation Assay)

Es un tampón preparado en nuestro laboratorio y conservado en nevera, que se renueva cada 6 meses. La composición del tampón de lisis RIPA fue la siguiente:

- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)..... 100mg
- Na deoxicolato.....500mg
- Igepal CA-630(Octylphenyl-polyethylene glycol)... 1ml
- PBS (Phosphate Buffer Saline).....c.s.p. 100ml

Este tampón se utiliza como vehiculo de los inhibidores de proteasas (ver epígrafe 2.2.4.1.).

2.2.1.2 Tampón de carga

La composición del tampón de carga fue la siguiente:

Tris HCl 1M pH 6.8.....	1.75 ml
Glicerol 100%.....	1.5 ml
SDS 10 %.....	140 µl
SDS.....	500 mg
Mercaptoetanol.....	1.5 ml
Bromofenol.....	1 mg
H ₂ O.....	110 µl

Se prepararon 5 ml de esta solución concentrada de tampón a pH 6.8 y se congeló en alícuotas de 100 µl. En el momento de su uso se diluyó convenientemente.

2.2.1.3 Tampón de electroforesis

Se preparó una solución 5 veces más concentrada que se conservó en nevera y, a partir de ésta, se realizaron diluciones en H₂O a pH 8.3 para ser utilizadas durante la electroforesis. Este tampón se renovó periódicamente. La composición del tampón concentrado de electroforesis fue la siguiente:

Trizma base.....30 g
Glicina.....144 g
SDS.....10 g
H₂O.....c.s.p. 1L

2.2.1.4 Tampón de transferencia

A partir de una solución madre se preparó una dilución para su utilización en la transferencia de las proteínas a la membrana. La solución madre tenía que ser completamente estéril, por lo que se esterilizó en autoclave en el momento de su preparación. Este tampon se renovó periódicamente. Su composición fue la siguiente:

Glicina.....144 g
Trizma base.....30 g
H₂O.....c.s.p. 1L

A partir de ésta, se preparó la solución de transferencia de acuerdo con la siguiente fórmula:

Solución madre.....100ml
Metanol.....200ml
H₂O.....700ml

2.2.1.5. TBS pH 7.5 (trizma buffer saline)

Su composición fue:

Trizma base.....2.4g
NaCl.....29.2g
H₂O.....c.s.p. 1L

A partir de esta disolución, se elaboró otra solución de lavado llamada TBST, la cual contenía un tensioactivo, el Tween 20, a una concentración de 0.1%. Se utilizó para lavar la membrana después de cada etapa.

2.2.1.6 Bloqueo de la membrana. Solución de leche al 5%

Se preparó disolviendo 5 g de leche en polvo semidesnatada en 100 ml deTBST.

2.2.1.7. Marcadores de Peso Molecular

El marcador de peso molecular utilizado en todos nuestros experimentos fue suministrado por Sigma[®] (Chemichrome Western Control). Se compone de un grupo de ocho proteínas de diferentes pesos moleculares que oscila entre 8 y 220 kDa, fácilmente identificables en el gel de electroforesis y en la membrana de transferencia por su diferente color. El marcador de peso molecular también contiene un patrón de transferencia de aproximadamente 50 kDa y que permite visualizar mediante quimioluminiscencia si la transferencia de proteínas del gel a la

membrana se realiza correctamente (**Figura 2.9**). Se sembraron 2 μ l del citado marcador en el primer pocillo del gel de electroforesis.

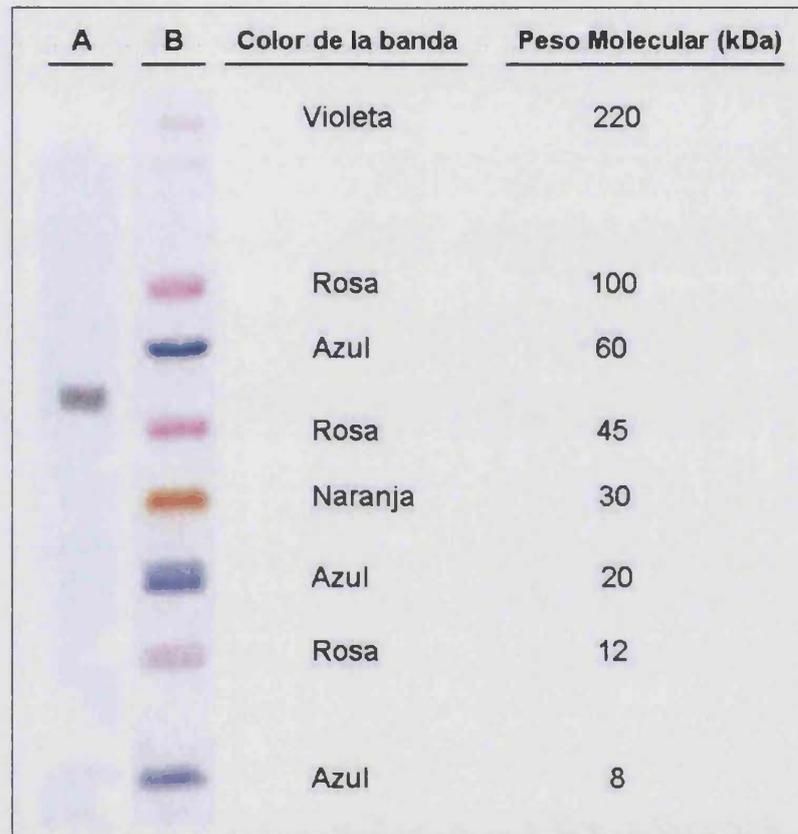


Figura 2.9. Visualización del marcador en la membrana de transferencia donde aparecen coloreados los distintos patrones en función de su Peso Molecular (**B**) así como el patrón de transferencia (**A**).

2.2.1.8 Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo fueron suministrados por Chemicon[®] (Millipore corporation-USA) mientras que el anticuerpo secundario fue suministrado por BIO-RAD[®] (California-USA). Para su mantenimiento y posterior utilización, se reconstituyeron con agua destilada, según el protocolo recomendado por el laboratorio

suministrador, y se les añadió la misma cantidad de glicerol, con el fin de asegurar su conservación en congelación durante más tiempo. Para la incubación de las membranas, todos los anticuerpos se diluyeron en una solución que contenía un 1% de leche en polvo en TBST de acuerdo con el siguiente esquema:

- Anti NMDA subunidad R1 obtenido en conejo (NR1). Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:1000.
- Anti NMDA subunidad R2A obtenido en conejo (NR2A). Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:1000.
- Anti NMDA subunidad R2B obtenido en conejo (NR2B). Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:1000.
- Anti IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con HRP (peroxidasa obtenida en rábano). Este anticuerpo secundario se utilizó en todos los experimentos, a una dilución 1:10000

2.2.2. Animales de experimentación

La rata albina macho de raza Wistar se empleó como animal de experimentación para la realización de estos experimentos.

Todos los animales se criaron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universitat de València, situado en la Facultat de Farmàcia, y se mantuvieron con una dieta sólida estándar en perfectas condiciones higiénicas y climáticas:

- Temperatura: 23 ± 1 °C
- Humedad: 60%
- Ciclos de luz y oscuridad : 12-12 horas (Conexión de 8:00 a 20:00)

Se emplearon animales de peso comprendido entre 390-500 g.

2.2.3 Protocolo experimental

2.2.3.1. Tratamiento agudo con acamprosato

Para la realización de este experimento, se utilizó un grupo de animales (grupo experimental, n=6) a los que se inyectó dos dosis de acamprosato (200 mg/Kg por vía i.p. en solución salina), separadas por un intervalo de 12 horas (8:00h-20:00h). La dosis se seleccionó en base a experimentos previos realizados por Rammes et al (2001). Los animales del grupo control (n=6), recibieron por vía i.p. dos inyecciones de igual volumen de solución salina, separadas por el mismo intervalo de tiempo que el grupo experimental.

2.2.3.2. Tratamiento crónico con acamprosato

Para llevar a cabo el tratamiento crónico con acamprosato, se emplearon dos grupos de animales. A los animales pertenecientes al grupo control (n=4) se les administró solución salina via i.p. durante 21 días cada 12 horas (8:00-20:00h). Los animales del grupo experimental (n=6) recibieron una solución de acamprosato, mediante inyección i.p., a la dosis de

200mg/kg, elaborada en solución salina, durante 21 días en intervalos de 12 horas (8:00h-20:00h).

2.2.4. Obtención y preparación de las muestras

El protocolo de obtención de las muestras fue el mismo tanto en el experimento de administración aguda del acamprosato, como en el de administración crónica. Entre 6-8 horas después de la última inyección, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de hidrato de cloral, y seguidamente decapitados para proceder rápidamente a la extracción del cerebro. Una vez extraído, el cerebro se congeló por inmersión a -30°C en isopentano. Tras un periodo de unas horas en isopentano, el cerebro fue convenientemente guardado en el congelador hasta el momento de la obtención de muestras.

Para la obtención de muestras, se realizaron cortes coronales del cerebro en un criostato de congelación a -14°C hasta visualizar y reconocer con exactitud las zonas del estudio (PFC, NAc e vHip). Una vez localizadas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1986) (**Figura 2.10**), se cortaron secciones de tamaño adecuado (1 mm aproximadamente de espesor), y las zonas objeto de estudio se extrajeron con ayuda de una punta de micropipeta cortada en el extremo, obteniéndose muestras de 10-20 mg que se depositaron en tubos eppendorf. La masa de tejido se mantuvo en congelación en todo momento hasta su procesado.

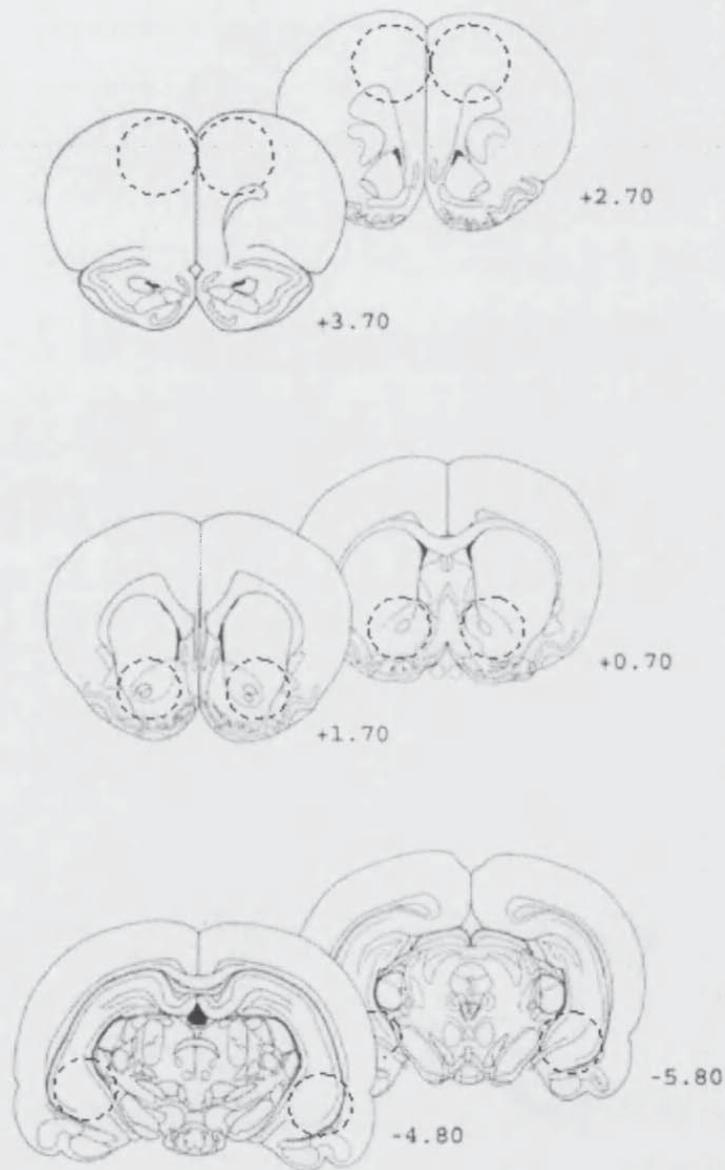


Figura 2.10. Representación gráfica de las diferentes zonas objeto de estudio según el atlas de Paxinos y Watson (1986). Los trazados indican aproximadamente el área extraída del tejido, mientras que las coordenadas indican los planos inicial y final de la sección utilizada.

2.2.4.1. Lisado y determinación de la cantidad de proteína

Para proceder al lisado de las células del tejido y la determinación de la cantidad de proteína presente en el sobrenadante, se preparó tampón de lisis RIPA al que se le incorporaron los siguientes inhibidores de proteasas (volumen añadido por cada ml de tampón RIPA):

- Leupeptina (4 mM).....10µl
- DTT (dithiothreitol) (1M)..... 1 µl
- Na Ortovanadato (100 mM).....10 µl
- Aprotinina (1mg/ml).....10 µl
- PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) (100 mM).....10µl

Cada una de las muestras de tejido, se colocó en un tubo de ensayo al que se añadió 250 µl del tampón de lisis con inhibidores. Se homogeneizó cada muestra 2 ó 3 segundos en un homogeneizador (UltraTurrax T-25 Basic) y seguidamente se dejó la muestra reposar aproximadamente 1 hora en un baño de hielo para facilitar la eliminación del aire incorporado durante la homogeneización. Una vez transcurrido el tiempo, el homogenato se introdujo en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 10 minutos a 13200 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se congelaron. Seguidamente, las muestras se diluyeron adecuadamente para proceder a la cuantificación de la proteína. Con este fin, se preparó una recta patrón a partir de una disolución de BSA (suero de albúmina bovina) de concentración de 1 mg/ml según el siguiente esquema de dilución:

Volumen BSA (1mg/ml)	Volumen H ₂ O	Concentración BSA (mg/ml)
2.5 µl	47.5 µl	0.5
5 µl	45 µl	0.10
10 µl	40 µl	0.20

A todos los tubos (muestras y patrones) se les añadió 1ml de reactivo **BIORAD**[®] comercial diluido previamente (1:4). Seguidamente se leyó la absorbancia de la recta patrón y de las muestras problema a una longitud de onda de 595 nm.

Mediante la interpolación de los valores de Abs de las muestras diluidas en la recta patrón se obtuvo la concentración de proteína en las muestras.

2.2.4.2. Preparación de geles y siembra de muestras

Como se ha comentado, para la separación de proteínas se utilizó la técnica SDS-PAGE (SDS-Polyacrilamida Gel electroforesis). Para ello, los geles de acrilamida se prepararon sobre un soporte comercial de **BIORAD**[®] que contenía 2 cristales entre los cuales había un espacio de 0.75 mm. Previamente los cristales se lavaron con alcohol 70°. Seguidamente se montaron los cristales sobre su soporte, se llenaron de agua para comprobar que no había fugas, se secaron, y se prepararon los geles, cuya composición fue:

- Gel de separación o resolución (Resolving gel): (acrilamida 7,5%)

H ₂ O.....	3.58 ml
Acrilamida.....	2.5 ml
Tris HCl 1M pH 8.8.....	3.75 ml
SDS 10 %.....	100 µl
PSA (Persulfato amónico).....	100 µl
Temed (Tetramethylethylenediamine-Sigma®).....	20 µl

El porcentaje de acrilamida en el gel fue seleccionado en función del tamaño molecular de las proteínas analizadas (120-180 kDa).

-Gel de concentración de la muestra (Stacking gel):

H ₂ O.....	3.52 ml
Acrilamida.....	0.75 ml
Tris HCl 1M pH 6.8.....	3.75 ml
SDS 10 %.....	50 µl
PSA.....	45 µl
Temed (Sigma®).....	7 µl

Los sobrenadantes se descongelaron y mantuvieron en baño de hielo. Se pipeteó el volumen adecuado de cada muestra para sembrar 20 ó 30 µg de proteína y se le añadió el tampón de carga en proporción adecuada. La cantidad de proteína a sembrar tras el tratamiento agudo (30 µg) o crónico (20 µg) con acamprosato fue seleccionada en base a experimentos previos realizados en nuestro laboratorio.

En cada uno de los geles fueron sembradas tanto muestras procedentes de ratas control como muestras procedentes de ratas tratadas con acamprosato de cada zona estudiada de acuerdo con el siguiente esquema:

Nº pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
muestra	MPM	C	A	C	A	C	A	C	A

MPM: Marcador de Peso Molecular; **C:** muestras procedentes de ratas control; **A:** muestras procedentes de ratas tratadas con acamprosato.

2.2.5. Electroforesis, transferencia a membrana, revelado y cuantificación.

Tras calentar las muestras a 100° C durante 2 minutos, éstas fueron cargadas en el gel y sometidas a una corriente eléctrica de 120 V durante 40 minutos en un equipo de electroforesis vertical modelo Mini-Protean 3 de BIORAD®. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular anteriormente citado.

Al finalizar la electroforesis, los geles se extrajeron de los cristales. Las proteínas, separadas por su peso molecular, se electrotransfirieron a membranas de PVDF (polyvinylidene fluoride- 0.45µm) en un equipo de transferencia modelo Mini Trans-Blot de BIORAD® a 100 V durante 1 hora en agitación y a 4°C. Previamente, las membranas de transferencia fueron activadas sumergiéndolas durante 10 minutos en metanol.

A continuación, el gel se sometió a una tinción en azul de coomasie al 1%, en una solución que contenía un 30% de metanol y un 10% de ácido acético durante 20 minutos.

Posteriormente, se procedió al bloqueo con el fin de prevenir la unión no específica a la membrana. Para ello, la membrana se mantuvo durante 1 hora a 37° C con leche descremada en polvo al 5% en TBST.

Una vez bloqueada la membrana, se lavó con TBST y se procedió a la incubación con anticuerpo primario a la dilución requerida según la subunidad a estudiar, durante toda la noche a 4°C en agitación.

A continuación, se lavó de nuevo la membrana con TBST y se procedió a la incubación de ésta con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. El método de revelado empleado fue la QUIMIOLUMINISCENCIA. Se utilizó el reactivo ECL Plus Western-Blotting Detection System (GE Healthcare®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en la oxidación del luminol por acción de la peroxidasa en presencia de un potenciador (Fenol) capaz de aumentar hasta 1000 veces la luz emitida por el luminol oxidado. Las proteínas son detectadas por su unión a anticuerpos conjugados directa o indirectamente a peroxidasa de rábano.

Los líquidos de revelado se mezclaron e incubaron durante 10 minutos sobre la membrana según las instrucciones. Posteriormente, se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se expuso un tiempo variable sobre una película de autorradiografías (Kodak®- MXB Film, 12x24 cm). Finalmente, se reveló la película en un aparato de revelado AGFA® que muestra las bandas del antígeno reconocido por el anticuerpo. Para su análisis, las películas se escanearon y las imágenes se cuantificaron con ayuda del programa Quantity One versión 4.6.2. (Biorad®). El parámetro utilizado para cuantificar las bandas presentes en la película fue el

volumen de la imagen de la banda que proporcionó el programa informático.

El valor medio del volumen obtenido tras el análisis de las muestras procedentes de ratas control sembradas en el mismo gel y pertenecientes a la misma zona de estudio, fue considerado como valor control y definido como 100%. Los valores de volumen obtenidos tras el análisis de las muestras procedentes de ratas tratadas con acamprosato y sembradas en el mismo gel, fueron expresados como porcentajes de la media de los controles.

2.2.6 Re-hibridación de las membranas

La técnica de re-hibridación de las membranas ("stripping", en terminología anglosajona) consiste en la eliminación del anticuerpo primario de las membranas, con el fin de reincubarlas con otros anticuerpos y detectar, en la misma membrana, la expresión de otras proteínas o del control de carga. Para ello, se ha de conseguir la máxima eliminación de los anticuerpos iniciales de la membrana al mismo tiempo que se mantiene la integridad del antígeno. Esta técnica elimina la necesidad de volver a correr geles y transferir a membrana cuando se desea detectar una nueva proteína en la muestra de tejido ya procesada. En nuestro caso, se utilizó el siguiente protocolo: se incubaron las membranas en una solución de pH 2.5 que contenía: Glicina 200 mM y SDS 0.4% durante 30 min, a 50 °C. Transcurrido este tiempo, se lavaron durante 30 min en agitación, quedando así las membranas preparadas para un nuevo análisis. Para efectuar nuestros experimentos, en primer lugar se incubó la membrana con el anticuerpo NR2A, seguidamente y

tras el stripping, la membrana se incubó con el anticuerpo NR2B, y por último, tras el segundo stripping, se incubó con el anticuerpo NR1.

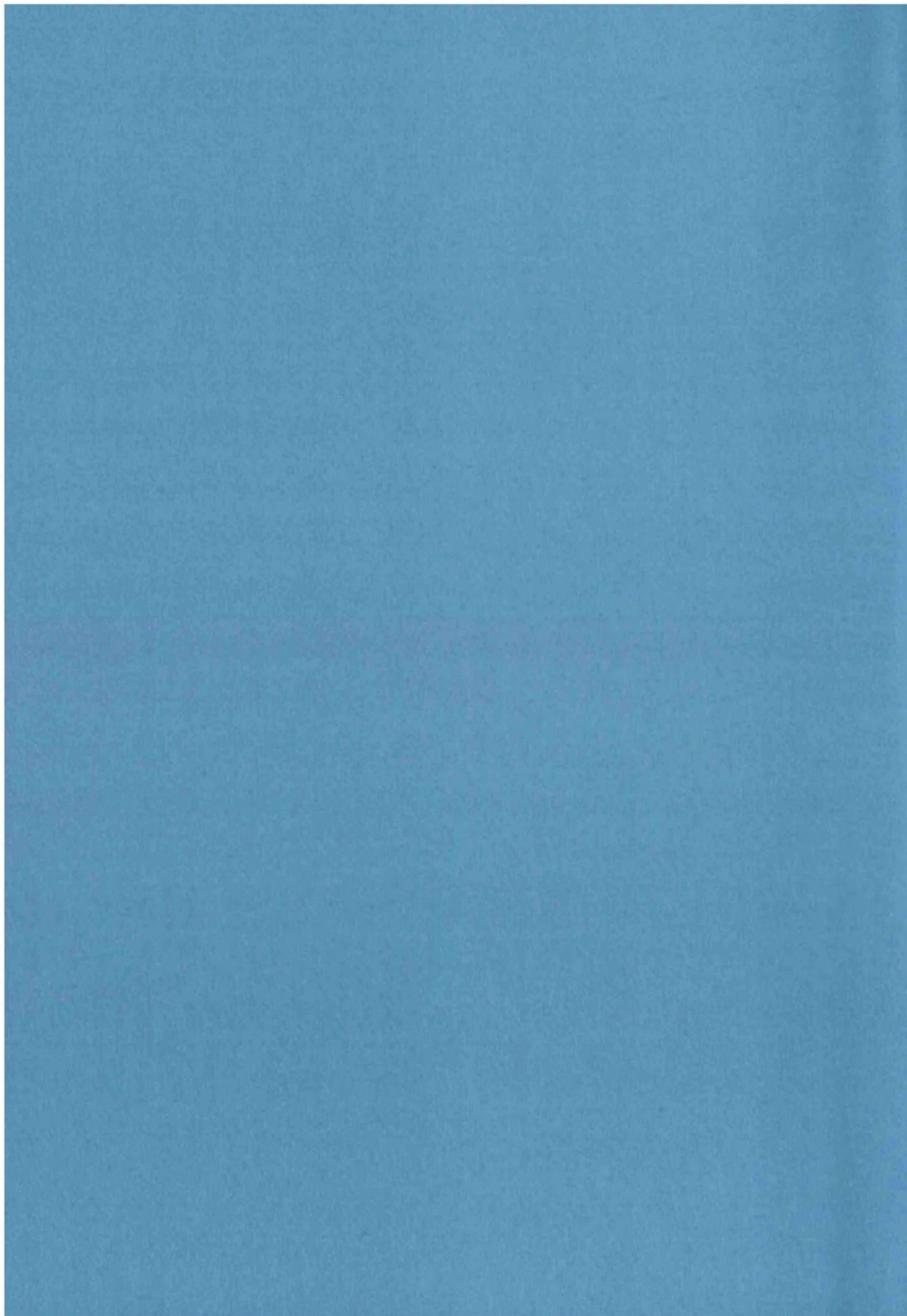
2.2.7. Evaluación de la técnica analítica: ensayo de linealidad.

Para comprobar la existencia de linealidad entre la cantidad de proteína sembrada y la señal cuantificada, se diseñó una recta patrón para cada subunidad, de tal forma que se sembraron cantidades crecientes de proteína (10, 20, 30 y 40 μg) y posteriormente se analizó la señal detectada. Para la realización de la recta patrón, se utilizaron únicamente muestras de tejido de la zona de PFC, puesto que, según los datos bibliográficos disponibles, esta zona es comúnmente utilizada para la realización de experimentos de western blot en los que analizaban expresión de subunidades proteicas del receptor NMDA (Kalluri et al, 1998; Anastasio and Johnson, 2008). Los resultados obtenidos a partir de la recta de regresión lineal, después de la valoración de los patrones, mostraron una excelente linealidad en función de la cantidad de proteína sembrada.

2.2.8 Expresión de los resultados

Como se ha indicado, se empleó el parámetro “volumen” que proporcionó el programa informático Quantity One para evaluar el tamaño de las bandas.

*Capítulo 3:
Resultados*



3.1 EXPERIMENTOS DE MICRODIÁLISIS

3.1.1. Evaluación de la técnica analítica. Ensayo de exactitud y reproducibilidad.

En la **figura 3.1** se representa, a modo de ejemplo, una recta de calibración obtenida tras la valoración mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de distintas soluciones patrón de DA en aCSF.

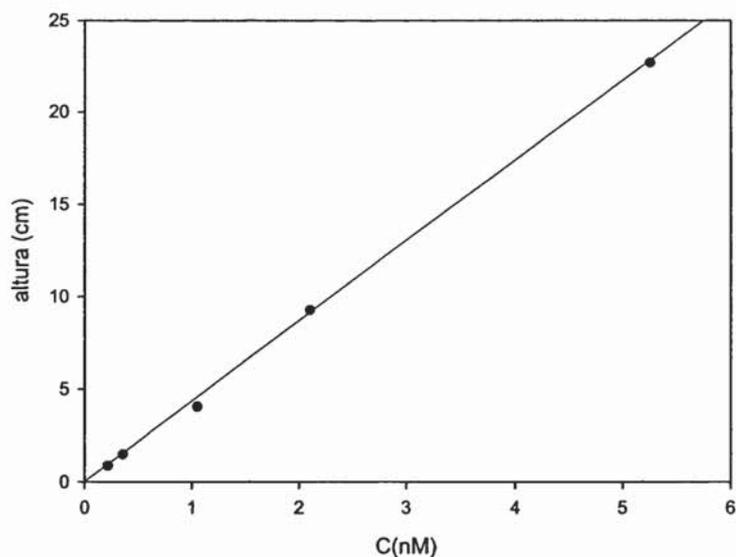


Figura 3.1 Representación gráfica de las alturas obtenidas para los patrones preparados, frente a la concentración de dopamina (C), expresada en nM, en una de las rectas preparadas. La línea trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad del método analítico. La ecuación de ajuste a estos puntos es la siguiente: $\text{Altura} = 4.356C - 0.134$ ($r > 0.999$)

Los datos de exactitud y reproducibilidad intraensayo obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en el **cuadro 3.1**

Ct (nM)	Cc(nM)	d.e.	C.V.(%)	n	% desv.
0.21	0.226	0.17	20	5	7.6
0.35	0.370	0.057	3	5	5.7
1.05	0.963	0.056	1.4	5	8.2
2.10	2.160	0.057	0.6	5	2.85
5.25	5.240	0.11	0.5	5	0.19

Cuadro 3.1 Ensayo de exactitud y reproducibilidad del método de valoración de DA en aCSF mediante HPLC. En la primera columna se representa la concentración teórica de DA presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo (Ct), expresada en nM. En la siguiente columna se indican los valores promedios de concentración de DA (Cc) en nM, calculados para un número de determinaciones igual a \bar{n} , siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación. En la última columna, se reseña la diferencia entre la concentración teórica y la concentración calculada de DA en forma de porcentaje (% desv.) del valor teórico.

3.1.2. Caracterización de la farmacología del acamprosato

3.1.2.1. Niveles basales de DA

Los valores medios de DA en niveles basales en los dializados obtenidos en NAc para los distintos experimentos no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales utilizados en los experimentos. Los valores basales fueron 1.91 ± 0.48 fmol/min.

3.1.2.2 Efecto de la perfusión local de acamprosato en los niveles extracelulares de DA en NAc

En los cuadros **3.2.**, **3.3** y **3.4** se muestran los valores de DA hallados en los dializados expresados como porcentaje con respecto al nivel basal, tras la perfusión local de acamprosato en NAc durante 40 minutos a las concentraciones de 0.05, 0.5 y 5 mM respectivamente. Los experimentos se realizaron sobre grupos de 5 ratas. Como se observa en la **Figura 3.2**, la aplicación local del acamprosato condujo a un incremento dosis-dependiente de la DA extracelular en NAc. Así pues, las dos concentraciones mayores del fármaco (5 y 0.5 mM) provocaron un incremento de la DA extracelular en NAc. El ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida detectó diferencias significativas para el tiempo ($F(7, 84)=15.428$, $p<0.0001$), para la interacción tiempo-concentración de acamprosato ($F(14, 84)=6.37$, $p<0.0001$) y para el efecto de la concentración de acamprosato ($F(2,12)=5.587$, $p=0.019$). El ANOVA de una vía de medidas repetidas realizado para cada una de las dosis confirmó que los incrementos en la DA extracelular provocados por el acamprosato a las concentraciones 5 y 0.5 mM fueron estadísticamente significativos, mientras que la concentración más baja (0.05mM) no tuvo ningún efecto significativo. El aumento máximo de los niveles de DA producido por la perfusión de 0.5 y 5 mM de acamprosato fue de 141 % y 210 % del nivel basal, respectivamente.

La concentración de DA volvió a los niveles basales tras finalizar el tratamiento con acamprosato.

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	98	101	103	108	109	104 \pm 2
40	102	92	98	98	106	99 \pm 3
60	109	103	103	106	89	102 \pm 4
80	90	107	91	98	96	96 \pm 3
100	96	96	94	98	94	96 \pm 2
120	111	114	89	106	99	104 \pm 4
140	109	124	84	114	89	104 \pm 7
160	127	113	84	106	96	105 \pm 7
180	147	108	74	90	99	104 \pm 12
200	108	101	74	81	99	93 \pm 6
220	106	98	79	90	128	100 \pm 8
240	111	100	84	98	109	100 \pm 5

Cuadro 3.2 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **0.05 mM** de acamprosato. Junto a los valores promedio se indica el error estándar (SEM).

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	106	88	103	101	99	101 \pm 3
40	100	94	96	105	98	99 \pm 2
60	106	94	100	97	105	100 \pm 3
80	95	111	100	92	104	100 \pm 4
100	93	114	100	105	120	106 \pm 6
120	122	137	118	139	152	134 \pm 6
140	132	164	127	164	121	141 \pm 9
160	107	152	124	151	112	129 \pm 10
180	101	117	109	147	85	112 \pm 10
200	111	117	118	151	134	126 \pm 7
220	116	129	105	134	85	114 \pm 8
240	111	129	100	126	116	117 \pm 5

Cuadro 3.3 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **0.5 mM** de acamprosato. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	100	92	111	101	102	101 \pm 5
40	93	102	99	92	93	96 \pm 4
60	103	102	97	96	102	100 \pm 4
80	100	97	97	113	110	103 \pm 7
100	104	107	97	98	93	100 \pm 5
120	223	155	143	165	161	170 \pm 14
140	290	214	171	242	136	210 \pm 27
160	240	174	166	171	140	178 \pm 17
180	165	119	129	78	110	120 \pm 14
200	174	99	120	80	169	128 \pm 19
220	160	93	115	84	85	107 \pm 14
240	153	102	120	77	93	109 \pm 13

Cuadro 3.4 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de 5 mM de acamprosato. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

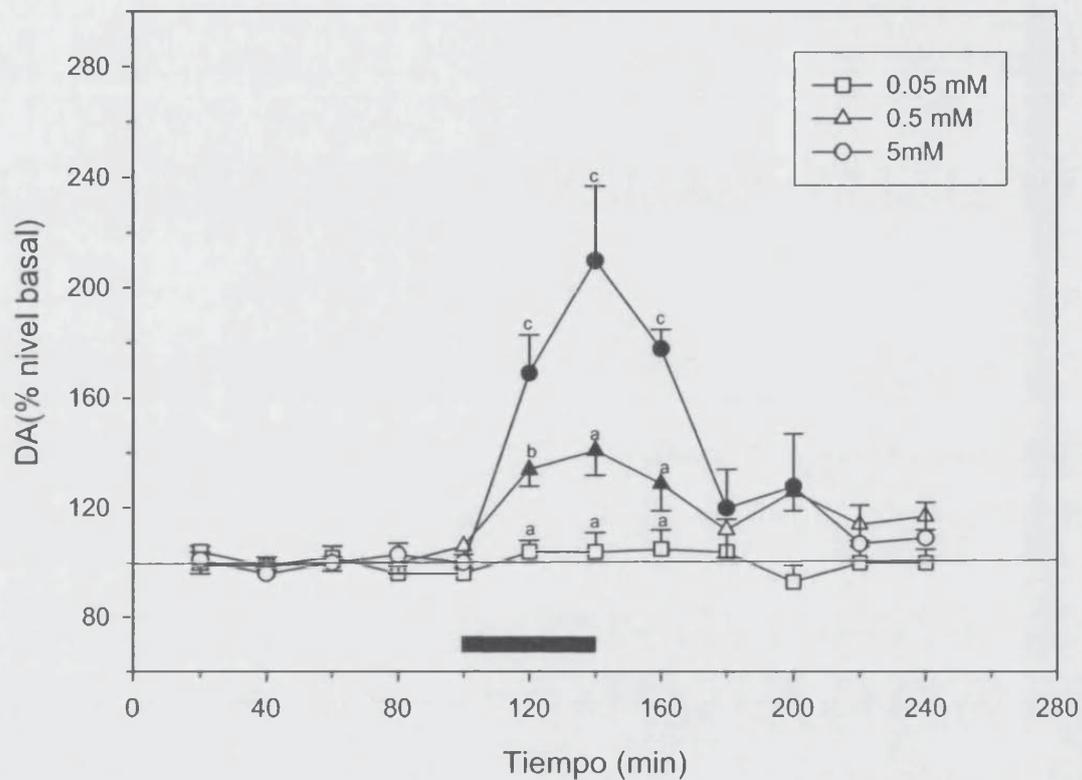


Figura 3.2 Efecto de la perfusión local de acamprosato sobre los niveles de DA en los dializados obtenidos en NAc. El acamprosato (0.05, 0.5 y 5 mM en aCSF) fue administrado durante 40 minutos a través de la sonda de microdialísis en el NAc (indicado por la barra de color negro). Se han representado los valores medios \pm SEM ($n=5$). Los símbolos en negro indican diferencias significativas ($p<0.05$) respecto a los valores basales (0-80 min) (ANOVA de una vía con el tiempo como medida repetida seguido de test de Dunnet). Letras diferentes (a,b,c) a los distintos tiempos indican diferencias significativas ($p<0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Scheffe) entre los grupos de ensayo para cada tiempo analizado.

3.1.2.3 Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA inducida por NMDA y PDC

3.1.2.3.1. Efecto del acamprosato sobre los cambios inducidos por el NMDA en los niveles de DA extracelular en NAc.

En este experimento, se perfundió el agonista NMDA, en ausencia y en presencia de acamprosato en el líquido de perfusión. Se utilizó la concentración de acamprosato de 0.05mM que, de acuerdo con los resultados descritos en el epígrafe anterior, no ocasiona cambios significativos en los niveles de DA en NAc.

En el cuadro **3.5** se muestran los valores de porcentaje de DA con respecto al nivel basal tras la perfusión local de NMDA en NAc durante 40 minutos a la concentración de 0.025 nM, mientras que en el cuadro **3.6** se muestran los valores de porcentaje de DA con respecto al nivel basal tras la perfusión de una solución de NMDA en presencia de acamprosato 0.05mM. En el cuadro **3.7** se muestran los valores de porcentaje de DA con respecto al nivel basal tras la perfusión local de NMDA en NAc durante 40 minutos a la concentración de 0.5 mM, mientras que en el cuadro **3.8** se muestran los valores de porcentaje de DA con respecto al nivel basal tras la perfusión de una solución de NMDA en presencia de acamprosato 0.05mM.

Los experimentos se realizaron sobre grupos de 5 ratas. Como se observa en la **Figura 3.3**, el NMDA aumentó de manera tiempo-dosis dependiente (ANOVA de una vía, $p < 0.001$ en ambas dosis) los niveles de DA en NAc. La concentración mas baja ensayada (0.025 mM, **Fig 3.3 A**) aumentó la concentración de DA al 126% del nivel basal ($P < 0.001$)

mientras que la concentración mas alta (0.5 mM, **Fig 3.3 B**) aumentó los niveles de DA hasta un 919% de los niveles basales ($P < 0.0001$).

El pretratamiento con acamprosato (0.05mM) 20 minutos antes y durante la administración de NMDA bloqueó completamente el aumento que se observó para la concentración de 0.025 mM (**Fig 3.3 A**) y atenuó el aumento observado tras la perfusión de NMDA 0.5 mM (**Fig 3.3 B**). Obsérvese que tras la perfusión de la combinación de NMDA 0.025 mM y acamprosato, los niveles de DA del dializado disminuyen significativamente respecto del nivel basal (**Fig 3.3 A**).

El ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida detectó diferencias significativas para el efecto del tiempo para las dos dosis de NMDA ensayadas ($[F(7,56)=2.926, p=0.011]$ para la dosis de 0.025mM de NMDA y $[F(7,56)=41.942, p<0.0001]$ para la dosis de 0.5 mM), para la interacción tiempo-tratamiento $[F(7,56)=5.293, p<0.0001]$ para la dosis de 0.025mM de NMDA y $F(7,56)=2.418, p<0.0001$ para la dosis de 0.5 mM), y para el efecto tratamiento ($F(1,8)=11.982, p=0.009$) sólo para la dosis de 0.025mM de NMDA, ya que este efecto no fue significativo para la dosis de 0.5 mM ($F(1,8)=4.034, p=0.079$).

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	95	96	89	103	92	95 \pm 2
40	97	102	89	110	105	101 \pm 4
60	101	96	90	101	95	96 \pm 2
80	104	104	110	92	112	104 \pm 4
100	106	100	112	101	105	105 \pm 2
120	106	119	122	94	105	109 \pm 5
140	133	135	125	110	115	124 \pm 5
160	135	139	132	96	128	126 \pm 8
180	119	105	143	79	89	107 \pm 11
200	129	102	125	75	95	105 \pm 10
220	135	115	138	75	89	110 \pm 12
240	116	90	112	79	102	100 \pm 7

Cuadro 3.5 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **0.025mM** de NMDA durante 40 minutos. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	103	109	109	113	91	105 \pm 4
40	92	97	102	101	100	98 \pm 2
60	105	92	86	97	100	96 \pm 3
80	100	101	102	88	103	99 \pm 3
100	89	101	117	94	106	101 \pm 5
120	83	92	102	94	103	95 \pm 4
140	66	88	81	85	59	76 \pm 6
160	79	92	81	97	63	82 \pm 6
180	89	84	67	71	50	72 \pm 7
200	92	84	71	74	44	73 \pm 8
220	89	84	83	76	56	78 \pm 6
240	76	101	88	98	44	81 \pm 10

Cuadro 3.6 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión de NMDA **0.025mM** en presencia de acamprosato **0.05mM**. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

Tiempo(min)	RATA					Media \pm SEM
	1	2	3	4	5	
20	95	110	106	104	96	102 \pm 3
40	107	99	99	97	102	101 \pm 2
60	100	99	99	111	94	101 \pm 3
80	100	106	97	83	105	98 \pm 5
100	108	76	99	104	113	100 \pm 7
120	933	465	924	639	1633	919 \pm 200
140	767	628	721	1125	1131	874 \pm 106
160	333	209	174	687	576	396 \pm 101
180	63	58	81	174	76	90 \pm 21
200	83	23	58	90	65	64 \pm 12
220	76	35	64	90	47	62 \pm 10
240	58	55	58	90	39	60 \pm 9

Cuadro 3.7 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **0.5 mM** de NMDA durante 40 minutos. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	91	107	96	92	97	97 \pm 3
40	91	99	96	92	91	94 \pm 2
60	91	99	95	105	109	100 \pm 4
80	102	99	106	109	104	104 \pm 2
100	124	95	117	92	149	115 \pm 10
120	925	786	489	644	406	650 \pm 95
140	742	794	277	368	319	500 \pm 111
160	339	233	165	218	163	224 \pm 32
180	91	46	80	57	25	60 \pm 12
200	91	31	85	46	25	56 \pm 14
220	91	27	74	34	22	50 \pm 14
240	81	27	74	46	33	52 \pm 11

Cuadro 3.8 porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión de NMDA 0.5 mM en presencia de acamprosato 0.05mM. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

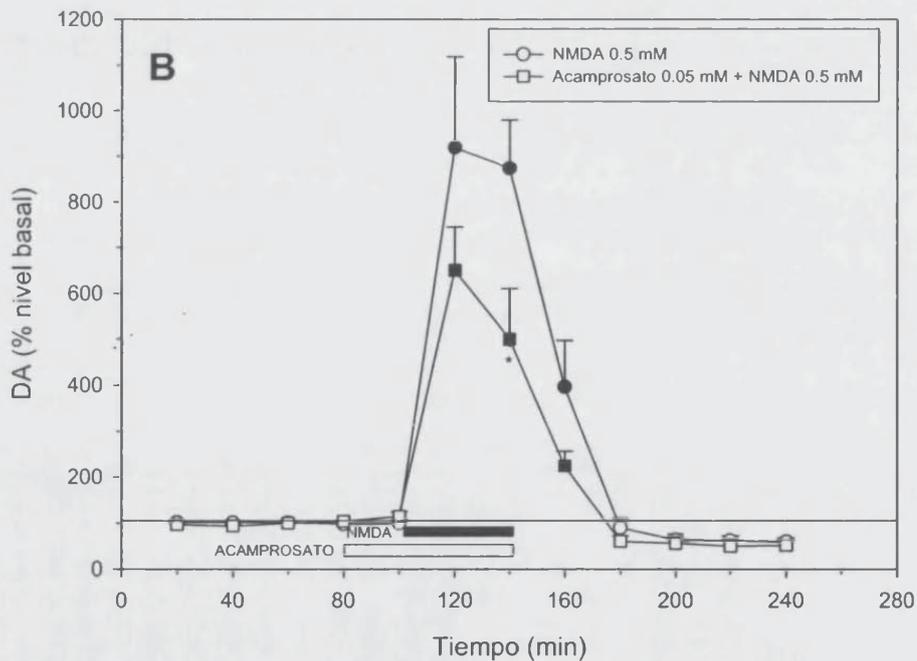
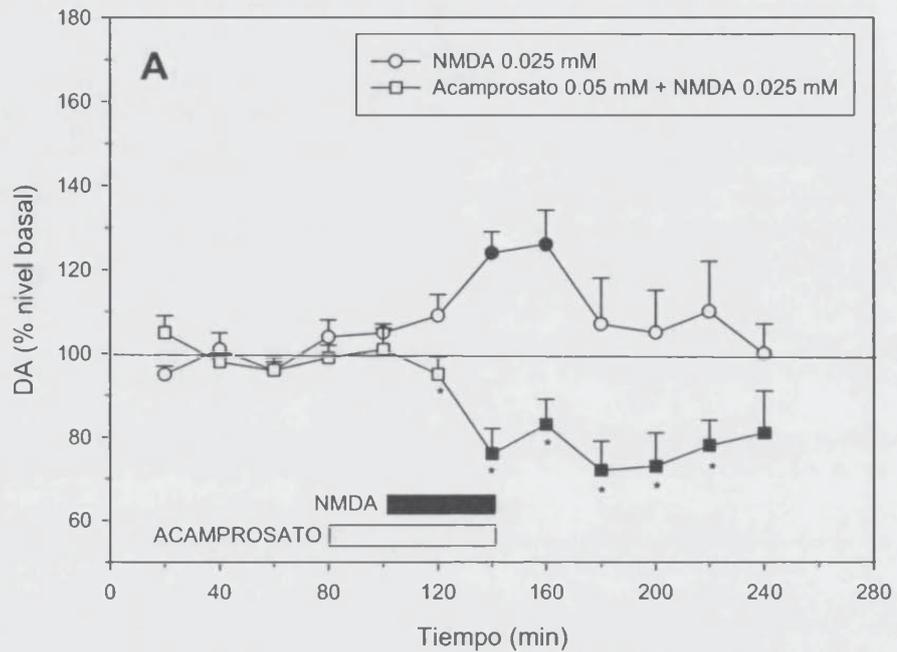


Figura 3.3 Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA inducida por NMDA. El NMDA (0.025 mM [A] o 0.5 mM [B]) fue administrado en el NAc de dos grupos de ratas durante 40 minutos (barras color negro). En dos grupos adicionales, se perfundió acamprosato 0.05mM (barras blancas) 20 minutos antes y durante la entrada de NMDA (40 minutos). Los resultados están expresados en media \pm SEM (n=5). Símbolos de color negro indican diferencias significativas ($p < 0.05$) comparado con su respectivo control (0-80 minutos) (ANOVA de una vía con el tiempo como medida repetida seguido del test de Dunnett). * $p < 0.05$ comparado con el grupo de 0.025 mM ó 0.5 mM de NMDA a los correspondientes tiempos (ANOVA de una vía).

3.1.2.3.2 *Efecto del acamprosato sobre los cambios inducidos por PDC en los niveles de DA extracelular en NAc.*

En este experimento, se perfundió el PDC, un inhibidor de la recaptación de Glu, con el fin de analizar la capacidad del acamprosato para bloquear la liberación de DA provocada por el aumento del Glu endógeno. Se utilizó la concentración de acamprosato de 0.05mM que, de acuerdo con los resultados descritos en el epígrafe 3.1.2.2., no ocasiona cambios significativos en los niveles de DA en NAc.

En el cuadro 3.9 se muestran los valores de porcentaje de DA obtenidos en el dializado con respecto al nivel basal tras la perfusión local de PDC en NAc a la concentración de 0.5 mM, mientras que en el cuadro 3.10 se muestran los valores de porcentaje de DA obtenidos en el dializado con respecto al nivel basal tras la perfusión de una solución de PDC 0.5 mM en presencia de acamprosato a la concentración de 0.05mM.

Los experimentos se realizaron sobre grupos de 5 ratas. Como se observa en la **Figura 3.4**, el PDC (0.5mM) provocó un incremento en la DA extracelular. El efecto máximo fue un incremento del 163% respecto al valor del control. El tratamiento con acamprosato 0.05 mM, 20 minutos antes y durante la entrada de PDC bloqueó completamente el incremento observado en los niveles de DA. Cuando fueron retirados el PDC y el acamprosato, los niveles de DA en el dializado disminuyeron claramente por debajo del valor basal (**Figura 3.4**). El análisis estadístico confirmó estas apreciaciones. Así, el ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida detectó diferencias significativas para el efecto del tiempo ($F(7,56)=4.889$, $p<0.0001$), para el efecto de la interacción tiempo-tratamiento ($F(7,56)=3.310$, $p=0.005$), y para el tratamiento ($F(1,8)=25.079$, $p=0.001$).

Tiempo(min)	RATA					Media \pm SEM
	1	2	3	4	5	
20	104	106	99	92	100	100 \pm 3
40	100	108	95	95	100	99 \pm 3
60	92	96	97	103	96	97 \pm 2
80	104	103	90	109	104	102 \pm 4
100	131	76	119	101	92	104 \pm 11
120	131	114	139	185	128	139 \pm 12
140	131	221	157	163	144	163 \pm 15
160	127	153	169	152	100	140 \pm 12
180	131	111	236	152	92	144 \pm 25
200	146	99	159	141	105	130 \pm 12
220	119	111	159	125	112	125 \pm 9
240	119	80	154	106	112	114 \pm 12

Cuadro 3.9 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **0.5 mM** de PDC. Junto a los valores promedio se indica la SEM.

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	87	89	97	96	110	96 \pm 5
40	95	95	99	96	103	98 \pm 2
60	107	109	102	101	96	103 \pm 3
80	109	106	102	98	94	102 \pm 3
100	57	103	99	88	97	89 \pm 9
120	66	120	128	121	80	103 \pm 13
140	77	112	116	149	66	104 \pm 15
160	45	95	83	91	49	73 \pm 11
180	60	95	64	76	52	69 \pm 7
200	42	81	57	58	52	58 \pm 6
220	48	89	52	58	59	61 \pm 7
240	66	89	60	51	62	66 \pm 6

Cuadro 3.10. Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de PDC **0.5mM** en presencia de acamprosato **0.05mM** . Junto a los valores promedio se indica la SEM.

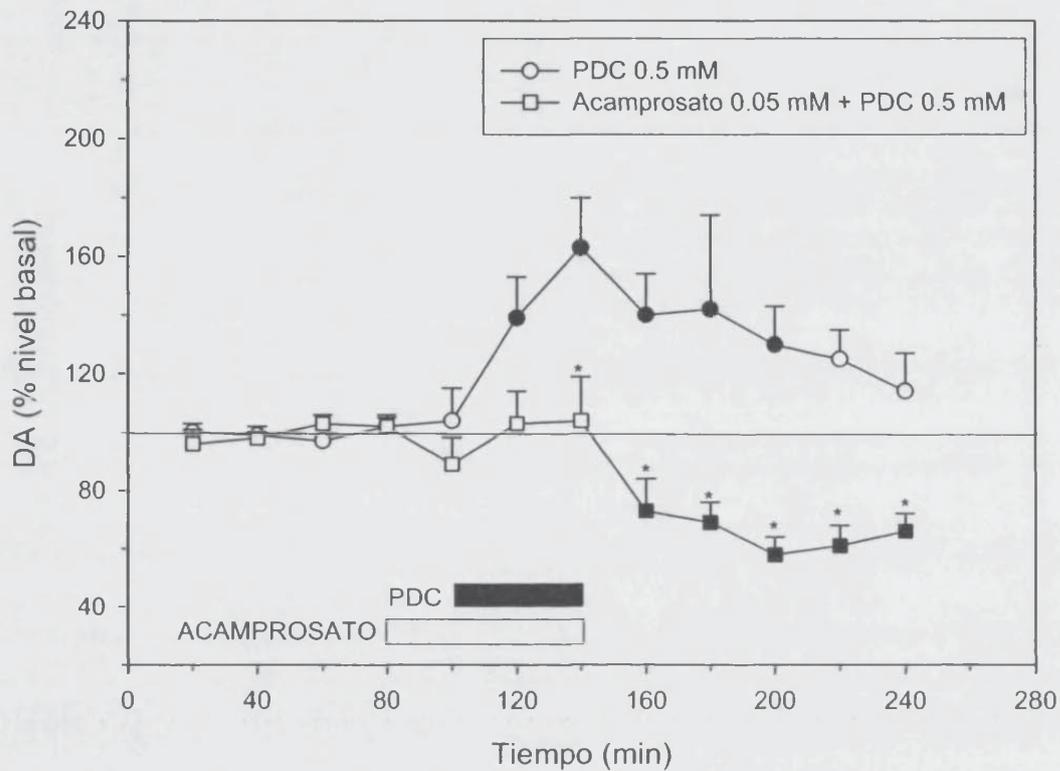


Figura 3.4 Efecto del acamprosato (0.05mM) sobre los cambios inducidos por PDC (0.5mM) en los niveles de DA obtenidos en los dializados en NAc. El PDC (0.5 mM) fue perfundido en el NAc en un grupo de ratas durante 40 minutos (barra negra). En otro grupo, se perfundió acamprosato 0.05mM en el NAc 20 minutos antes y durante la entrada de PDC. Los resultados están expresados como medias \pm SEM (n=5). Símbolos de color negro indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a su respectivo nivel basal (0-80 minutos) (ANOVA de una vía con el tiempo como medida repetida seguido del test de Dunnet). * $p < 0.05$ comparando ambos grupos experimentales a los distintos tiempos (ANOVA de una vía).

3.1.2.4. Efectos del AP5 en los niveles de DA extracelular en NAc inducidos por acamprosato

Con el fin de averiguar si el acamprosato actúa como antagonista o como agonista parcial del receptor NMDA, se diseñó el presente experimento que utilizó el AP5, un reconocido antagonista selectivo de dicho receptor. Si el acamprosato y el AP5 tuvieran el mismo mecanismo de acción (antagonistas del receptor NMDA) sus efectos sobre los niveles de DA deberían ser aditivos. Por el contrario, si el acamprosato actuara como un antagonista parcial del receptor, la co-perfusión con AP5 reduciría los efectos del fármaco. Así pues, se co-perfundió AP5 (0.4 mM) con acamprosato a una concentración de 0.5mM y se midieron los niveles de DA en el dializado. Se compararon estos resultados con los obtenidos cuando se perfundió únicamente acamprosato 0.5 mM (ver epígrafe 3.1.2.1). Se seleccionó esta concentración de acamprosato porque de las ensayadas anteriormente (ver figura 3.2) es la que provocó un aumento moderado de los niveles de DA extracelular (141% del nivel basal). La concentración de AP5 (0.4 mM) fue seleccionada en base a experimentos anteriores (datos no expuestos aquí) que ponían de manifiesto que esa concentración era inferior a la requerida para aumentar los niveles de DA extracelular en NAc.

En el cuadro 3.11 se muestran los valores de porcentaje de DA tras la perfusión de una solución de AP5 0.4 mM durante 20 minutos seguida de una solución que contenía 0.4 mM de AP5 y 0.05 mM de acamprosato durante 40 minutos.

La **figura 3.5** muestra que el AP5 fue incapaz de reducir el efecto máximo producido por el acamprosato sobre los niveles de DA en NAc. Al contrario, la presencia de AP5 tendió a incrementar (aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas) el efecto del acamprosato sobre los niveles de DA. Así, el incremento máximo de los niveles de DA fue de aproximadamente el 141% cuando se perfundió acamprosato 0.5 mM, y de 167% cuando este se coperfundió con AP5.

El ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida detectó diferencias significativas para el efecto del tiempo ($F(8,56)=20.399$, $p<0.0001$) y para la interacción tiempo-tratamiento ($F(8,56)=3.657$, $p=0.002$), mientras que no se detectaron diferencias significativas para el factor tratamiento ($F(1,7)=0.070$, $p=0.798$).

RATA					
Tiempo(min)	1	2	3	4	Media \pm SEM
20	99	105	93	107	101 \pm 3
40	90	105	111	98	101 \pm 5
60	110	95	95	98	99 \pm 4
80	101	95	101	107	101 \pm 3
100	110	101	103	107	105 \pm 2
120	101	124	96	137	115 \pm 10
140	121	146	136	156	140 \pm 7
160	163	175	163	166	167 \pm 3
180	141	124	139	117	130 \pm 6
200	110	105	104	102	105 \pm 2
220	108	107	103	98	104 \pm 2
240	100	105	95	107	102 \pm 3
260	100	93	83	117	98 \pm 7

Cuadro 3.11. Porcentajes individuales y promedios de DA a los tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la co-perfusión local de acamprosato 0.5 mM y AP5 0.4 mM. Junto a los valores promedio se indica la SEM.

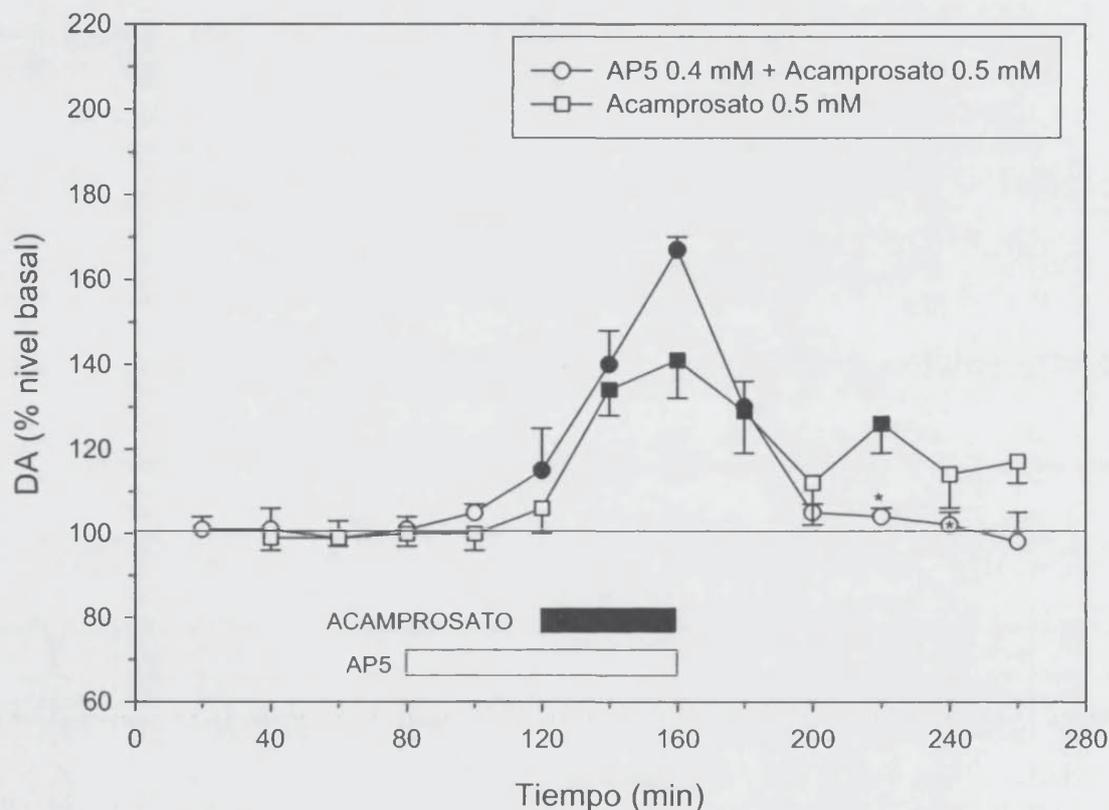


Figura 3.5 Efecto del AP5 (400 μM) sobre los cambios inducidos por acamprosato (0.5 mM) en los niveles de DA obtenidos en los dializados en NAc. El AP5 (0.4 mM) se perfundió (barra blanca) en el NAc 40 min antes, y durante la perfusión de acamprosato (0.5 mM). Para poder comparar estos resultados con el efecto de la perfusión de acamprosato (0.5 mM) sobre los niveles de DA en NAc (gráfica extraída de la Figura 3.2) Los resultados están expresados como valores medios \pm SEM (n=4). Símbolos de color negro indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los niveles basales (0-80 minutos) (ANOVA de una vía con el tiempo como medida repetida seguido del test de Dunnet). * $p < 0.05$ comparando ambos grupos experimentales a los distintos tiempos (ANOVA de una vía).

3.1.2.5. Efecto del acamprosato sobre la liberación de DA en NAc mediada por la estimulación química del Hipocampo ventral (vHip)

En el cuadro **3.12** se muestran los valores de porcentaje de DA en los dializados obtenidos en NAc con respecto al nivel basal, tras la perfusión de NMDA en vHip durante 40 minutos a la concentración de 5 mM, mientras que en el cuadro **3.13** se muestran los valores de porcentaje de DA en los dializados obtenidos en NAc con respecto al nivel basal tras la perfusión de acamprosato en NAc a una concentración de 0.05mM y de NMDA 5mM en vHip.

La aplicación de NMDA 5mM en el vHip del grupo control produjo un aumento significativo de los niveles de DA en el NAc ipsilateral (**Fig 3.6**). La respuesta a la estimulación se empezó a detectar después de 60 minutos de la finalización de la perfusión con NMDA, y condujo a un aumento máximo del 150%. El aumento fue estable en el tiempo, de modo que al final del experimento los valores de DA en los dializados constituían el 148% de los nivel basales.

La perfusión de 0.05mM de acamprosato en el NAc de los animales del grupo control eliminó el aumento de DA en NAc producida por la estimulación del vHip.

El ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida confirmó estadísticamente estas observaciones. El ANOVA detectó diferencias significativas para el factor tiempo ($F(10,80)=6,359$, $p<0.0001$), para la interacción tiempo-tratamiento ($F(10,80)=5.260$, $p<0.0001$), y para el efecto tratamiento ($F(1,8)=12.895$, $p=0.007$).

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	92	108	100	93	101	99 \pm 4
40	97	93	100	98	96	97 \pm 2
60	108	97	100	110	104	104 \pm 2
80	103	101	91	110	107	102 \pm 4
100	111	93	91	119	111	105 \pm 6
120	103	112	97	124	103	114 \pm 7
140	111	124	106	126	122	126 \pm 7
160	211	116	115	128	113	125 \pm 7
180	314	159	124	133	154	144 \pm 7
200	168	174	115	147	146	150 \pm 10
220	178	159	136	138	138	147 \pm 6
240	157	158	136	135	135	144 \pm 5
260	162	158	148	135	130	144 \pm 5
280	135	158	161	128	135	148 \pm 7

Cuadro 3.12 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos ensayados en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **5mM** de NMDA en vHip durante 40 minutos. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

Tiempo(min)	RATA					Media \pm SEM
	1	2	3	4	5	
20	95	99	109	102	96	100 \pm 3
40	96	98	106	94	100	99 \pm 3
60	110	101	92	105	108	103 \pm 3
80	110	102	92	99	96	100 \pm 4
100	120	112	98	107	120	111 \pm 4
120	145	112	104	115	116	118 \pm 7
140	131	93	106	115	120	113 \pm 6
160	120	99	104	113	120	111 \pm 4
180	106	103	121	110	120	112 \pm 4
200	99	82	104	121	120	105 \pm 7
220	99	93	104	134	120	110 \pm 7
240	85	127	109	140	120	116 \pm 9
260	88	112	104	148	120	114 \pm 10
280	88	96	109	137	120	110 \pm 9

Cuadro 3.13 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de NMDA 5mM en vHip y acamprosato 0.05 mM en NAc. Junto a los valores promedio se indica el SEM.

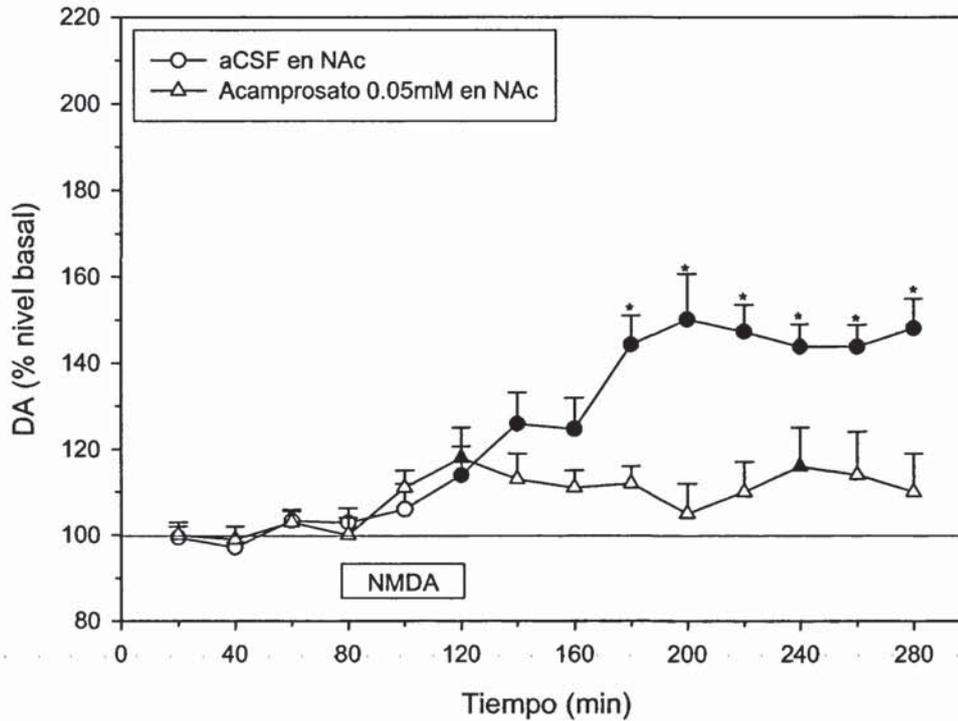


Figura 3.6 Efecto de la perfusión de **NMDA 5mM** en el **vHip** sobre los niveles de DA en NAc (media de los niveles basales \pm SEM), durante la perfusión de acamprosato (**0.05mM**) (Δ , $n=5$) o durante la perfusión de aCSF (\circ , $n=5$) en NAc. Los cuatro primeros puntos representan los niveles basales de DA, y los siguientes representan las muestras recogidas durante y después de la administración de NMDA en vHip (barra blanca horizontal). Los símbolos en color negro indican diferencias significativas respecto a la línea base (ANOVA de una vía con el tiempo como medida repetida seguido de test de Dunnet, $p<0.05$). * $p<0.05$ en comparación con el grupo control (aCSF en NAc) en sus correspondientes fracciones de tiempo (ANOVA de una vía).

3.1.2.6. Efecto de la perfusión de acamprosato en VTA sobre los niveles de DA extracelular en NAc

En los cuadros **3.14**, **3.15** y **3.16** se muestran los valores de porcentaje de DA en los dializados obtenidos en NAc con respecto al nivel basal tras la perfusión local de acamprosato en VTA durante 40 minutos a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 5 mM respectivamente. Los experimentos se realizaron sobre grupos de 5 ratas (n=5). Como se observa en la **Figura 3.7**, la perfusión local de 0.1 mM de acamprosato en VTA produjo un incremento moderado aunque significativo sobre los niveles de DA extracelular en NAc de alrededor del 10 % del valor basal mientras que a las concentraciones de 0.5mM y 5 mM, el acamprosato provocó cambios tendentes hacia una disminución de los niveles de DA en NAc (en torno al 18% de los obtenidos en los valores basales). El ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida detectó diferencias significativas para el efecto de la dosis de acamprosato ($F(2,12)= 5.096$, $p < 0.025$), mientras que para el tiempo y para la interacción dosis de acamprosato-tiempo, no se detectaron diferencias significativas [($F(8,96)=1.434$, $p=0.192$) y ($F(16,96)=1.514$, $p=0.110$) respectivamente].

Para validar funcionalmente la posición de las sondas, al finalizar el experimento de microdialisis se perfundió a través de la sonda colocada en VTA una solución de baclofen 50 μ M durante 40 min. Según estudios anteriores de Westerink et al (1996), el baclofen perfundido localmente en VTA a la misma concentración, disminuye significativamente la concentración de DA extracelular en NAc aproximadamente hasta un 35% del nivel basal. De acuerdo con estos datos, la medición de los efectos del baclofen sobre los niveles de DA en NAc sirvió para validar

funcionalmente la correcta implantación de las sondas a la espera de la validación histológica complementaria.

Tiempo(min)	RATA					Media \pm SEM
	1	2	3	4	5	
20	97	93	100	109	100	100 \pm 3
40	102	100	96	99	100	99 \pm 1
60	101	107	100	95	109	102 \pm 3
80	99	98	104	102	97	99 \pm 3
100	102	102	100	95	100	100 \pm 2
120	107	99	131	119	105	112 \pm 6
140	107	102	100	124	127	112 \pm 6
160	110	104	100	109	100	105 \pm 2
180	105	104	100	114	109	106 \pm 2
200	107	116	108	114	105	110 \pm 2
220	107	112	96	104	109	106 \pm 3
240	103	102	100	114	109	106 \pm 3
260	106	100	104	114	127	110 \pm 5
280	73	85	92	70	77	80 \pm 4
300	66	74	54	40	55	58 \pm 6

Cuadro 3.14 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de **0.1 mM** de acamprosato en VTA (min 120-160) y posterior perfusión de baclofen **50 μ M** (min 260-300). Junto a los valores promedio se indica el SEM.

Tiempo(min)	RATA					Media \pm SEM
	1	2	3	4	5	
20	94	93	94	99	98	96 \pm 2
40	102	100	103	101	107	102 \pm 2
60	100	104	103	104	107	103 \pm 1
80	104	100	103	96	98	100 \pm 2
100	98	104	116	135	90	109 \pm 8
120	94	100	116	92	82	97 \pm 6
140	94	93	90	111	82	94 \pm 5
160	100	91	86	99	66	88 \pm 6
180	118	100	82	111	98	102 \pm 6
200	116	108	77	111	74	97 \pm 9
220	118	103	69	106	66	92 \pm 11
240	104	110	64	101	74	91 \pm 9
260	100	104	73	106	74	91 \pm 7
280	76	95	60	72	66	74 \pm 6
300	50	60	52	63	33	51 \pm 5

Cuadro 3.15 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de acamprosato **0.5mM** en VTA (min 120-160) y posterior perfusión de baclofen **50 μ M** (min 260-300). Junto a los valores promedio se indica el SEM.

RATA						
Tiempo(min)	1	2	3	4	5	Media \pm SEM
20	109	92	100	95	105	100 \pm 3
40	101	108	100	98	100	101 \pm 2
60	97	100	100	104	100	100 \pm 2
80	101	100	100	98	95	99 \pm 2
100	93	92	100	104	86	95 \pm 3
120	89	85	111	98	100	97 \pm 5
140	78	77	94	98	62	82 \pm 7
160	74	88	83	87	76	82 \pm 3
180	74	85	67	110	90	85 \pm 7
200	78	92	83	110	100	93 \pm 6
220	74	100	83	121	100	96 \pm 8
240	89	85	89	104	100	93 \pm 4
260	93	85	100	101	100	96 \pm 3
280	66	31	83	72	71	64 \pm 9
300	58	31	56	46	76	53 \pm 8

Cuadro 3.16 Porcentajes individuales y promedios de DA a los distintos tiempos de ensayo en los dializados obtenidos en NAc tras la perfusión local de acamprosato 5mM en VTA (min 120-160) y posterior perfusión de baclofen 50 μ M (min 260-300). Junto a los valores promedio se indica el SEM.

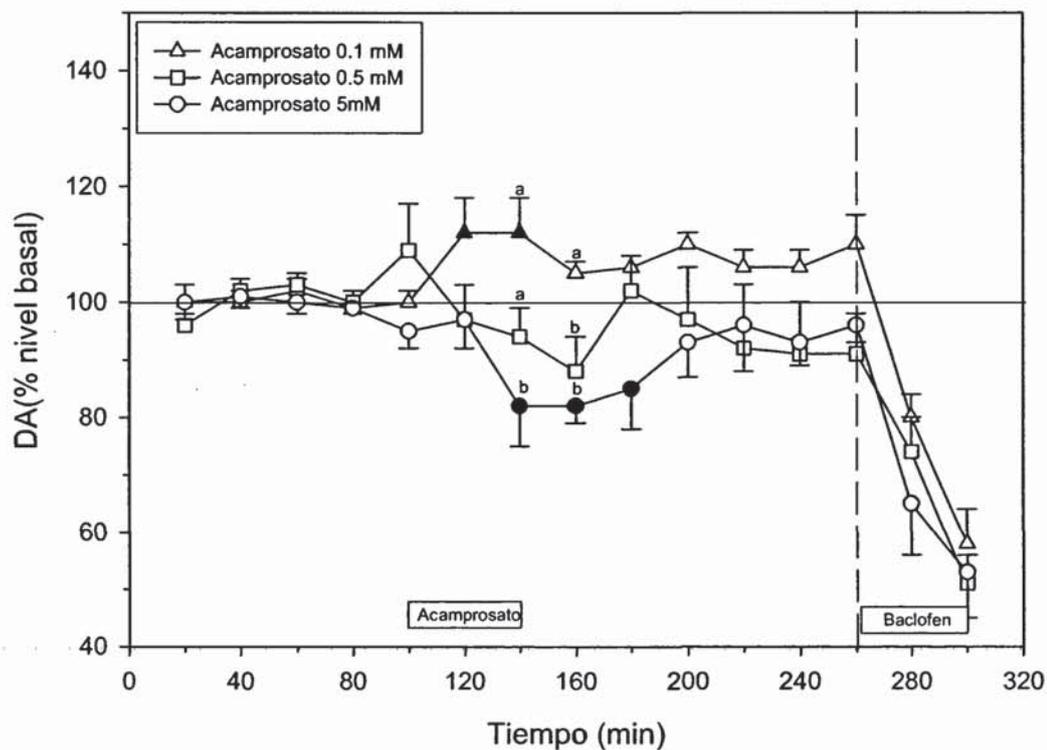
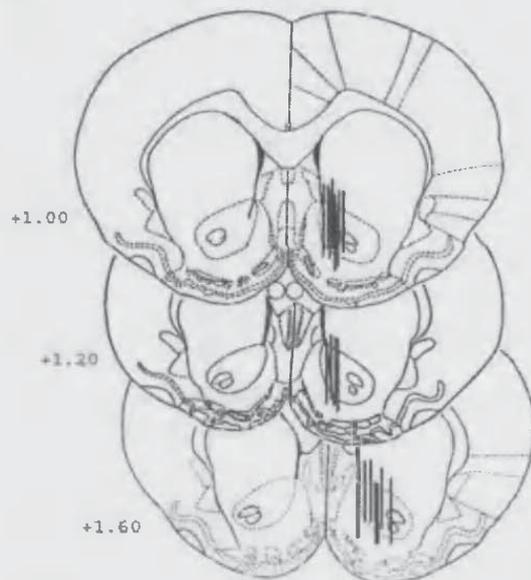


Figura 3.7 Efecto de la perfusión de acamprosato 0.1 mM (Δ , $n=5$), 0.5 mM (\square , $n=5$) y 5 mM (\circ , $n=5$) en VTA sobre los niveles de DA obtenidos en los dializados en NAc (valores medios \pm SEM). Los cuatro primeros puntos representan las muestras correspondientes a los niveles basales de DA, y los siguientes puntos representan niveles de DA recogidos tras la perfusión de acamprosato (marcada en la gráfica con una barra horizontal). Los símbolos de color negro indican diferencias significativas con respecto a la línea base (test de Dunnett, $p<0.05$). (a,b) Diferentes letras indican diferencias significativas entre las distintas dosis a sus correspondientes tiempos (ANOVA de una vía seguido de prueba de Scheffe).

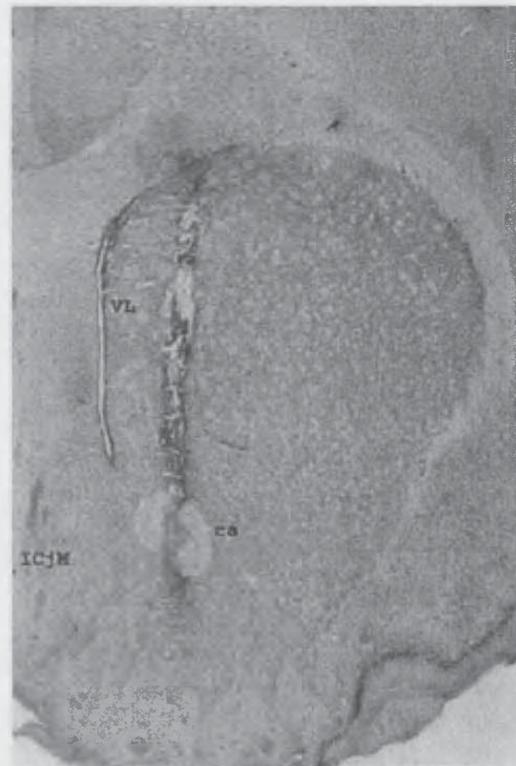
3.1.3 Validación histológica de la posición de las sondas de microdiálisis

El emplazamiento de las sondas de microdiálisis fue examinado siempre al término del experimento.

En las **Figuras 3.8, 3.9 y 3.10** se esquematizan la posición de las sondas de microdiálisis de nuestros experimentos según el atlas de Paxinos y Watson (1986). Las ratas cuyas sondas se encontraron fuera de estos planos de corte, no se incluyeron en el análisis de los resultados.



A



B

Figura 3.8 (A) Emplazamiento de las sondas de microdiálisis en NAc correspondientes a los distintos experimentos realizados según el atlas de Paxinos y Watson. Las coordenadas que se indican corresponden a la distancia respecto al punto bregma. **(B)** Fotografía de una sección histológica representativa teñida mediante la técnica de Nissl, donde se observa el tracto de la sonda de microdiálisis. VL: ventrículo lateral, ca: comisura anterior, ICjM: islotes de Calleja Magna.

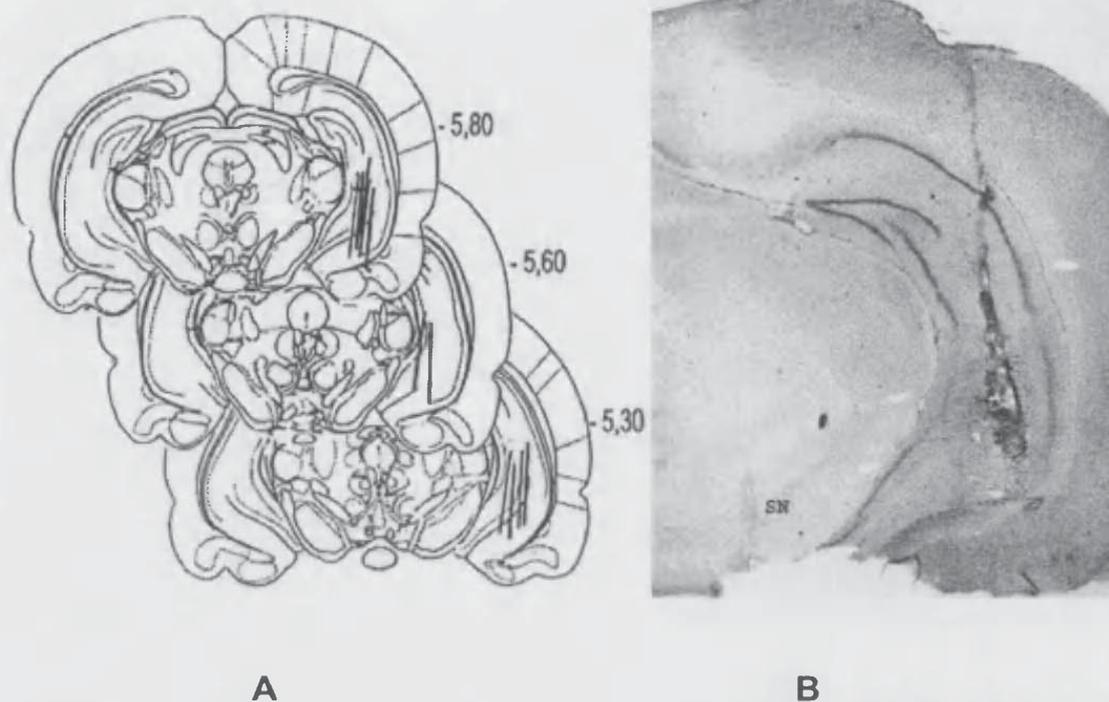


Figura 3.9 (A) Emplazamiento de las sondas ubicadas en vHip según el atlas de Paxinos y Watson (1986) correspondientes a los distintos experimentos realizados. Las coordenadas que se indican corresponden a la distancia respecto al punto bregma. **(B)** Fotografía de una sección histológica representativa teñida mediante la técnica de Nissl, donde se observa el tracto de la sonda de microdiálisis. SN: sustancia nigra.

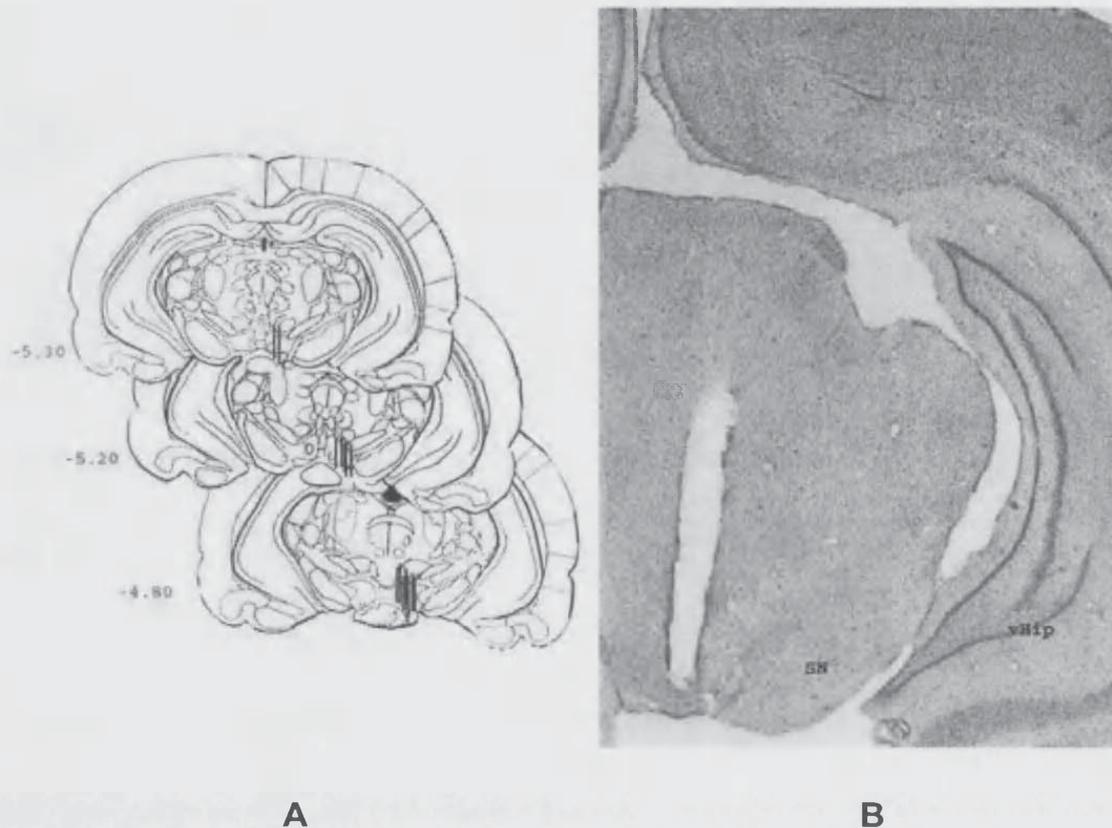


Figura 3.10 (A) Emplazamiento de las sondas ubicadas en VTA según el atlas de Paxinos y Watson (1986) correspondientes a los distintos experimentos realizados. Las coordenadas que se indican corresponden a la distancia respecto al punto bregma. **(B)** Fotografía de una sección histológica representativa teñida mediante la técnica de Nissl, donde se observa el tracto de la sonda de microdiálisis. Las secciones histológicas fueron realizadas con el fin de posicionar correctamente la sonda de microdiálisis. SN: sustancia nigra, vHip: Hipocampo ventral.

3.2 EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT

3.2.1. Evaluación de la técnica: ensayo de linealidad

En las **figura 3.11, 3.12 y 3.13** se representan, a modo de ejemplo, una recta de calibración obtenida tras la cuantificación de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA, en muestras provenientes de la PFC, mediante la técnica de Western blot. Como se observa, en el ámbito estudiado, existe una excelente linealidad entre la cantidad de proteína sembrada y la señal que se cuantifica mediante el parámetro volumen del programa Quantity One.

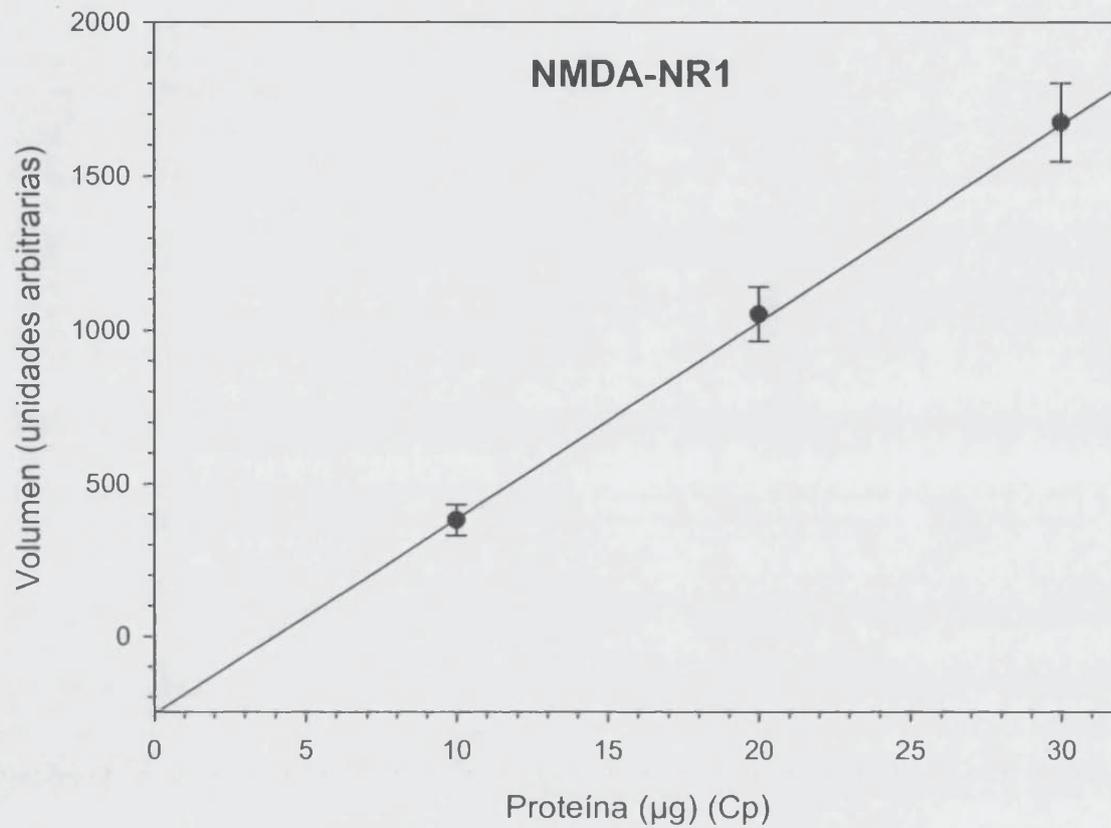


Figura 3.11 Representación gráfica del volumen obtenido en la lectura de las bandas de las membranas, frente a la cantidad de proteína sembrada ($n=2$; muestras de PFC), expresada en μg . La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad en el ámbito ensayado.

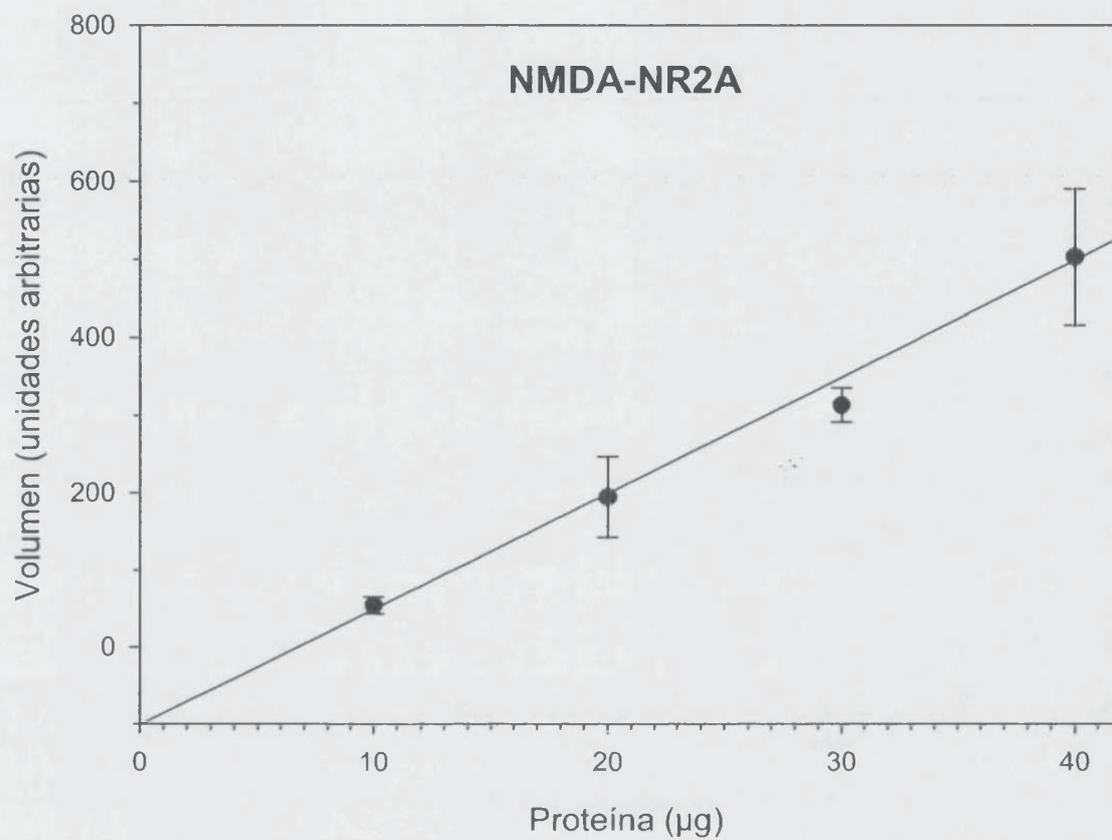


Figura 3.12 Representación gráfica del volumen obtenido en la lectura de las bandas de las membranas, frente a la cantidad de proteína sembrada ($n=2$; muestras de PFC), expresada en μg . La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad en el ámbito ensayado.

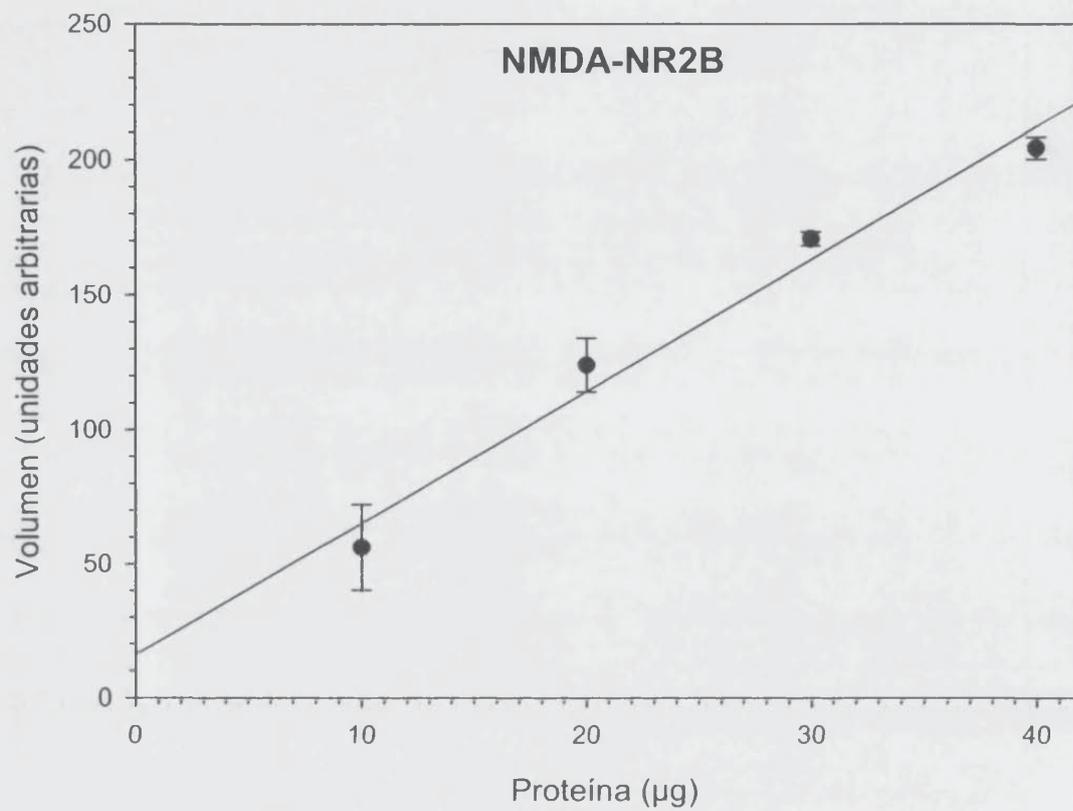


Figura 3.13 Representación gráfica del volumen obtenido en la lectura de las bandas de las membranas, frente a la cantidad de proteína sembrada ($n=2$; muestra de PFC), expresada en μg . La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad en el ámbito ensayado.

3.2.2. Tratamiento agudo con acamprosato

3.2.2.1. Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA

En la **figura 3.14** se muestran los niveles de expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA (media \pm SEM) en las distintas áreas cerebrales ensayadas (PFC, NAc e vHip) en animales control (n=4) y en animales sometidos a tratamiento agudo con acamprosato (n=4). Como se observa, y de acuerdo con el análisis estadístico (t de Student), dicho tratamiento no produjo cambios significativos de los niveles de la proteína en ninguna de las zonas estudiadas: PFC (p=0.87); NAc (p=0.89); vHip (p=0.33).

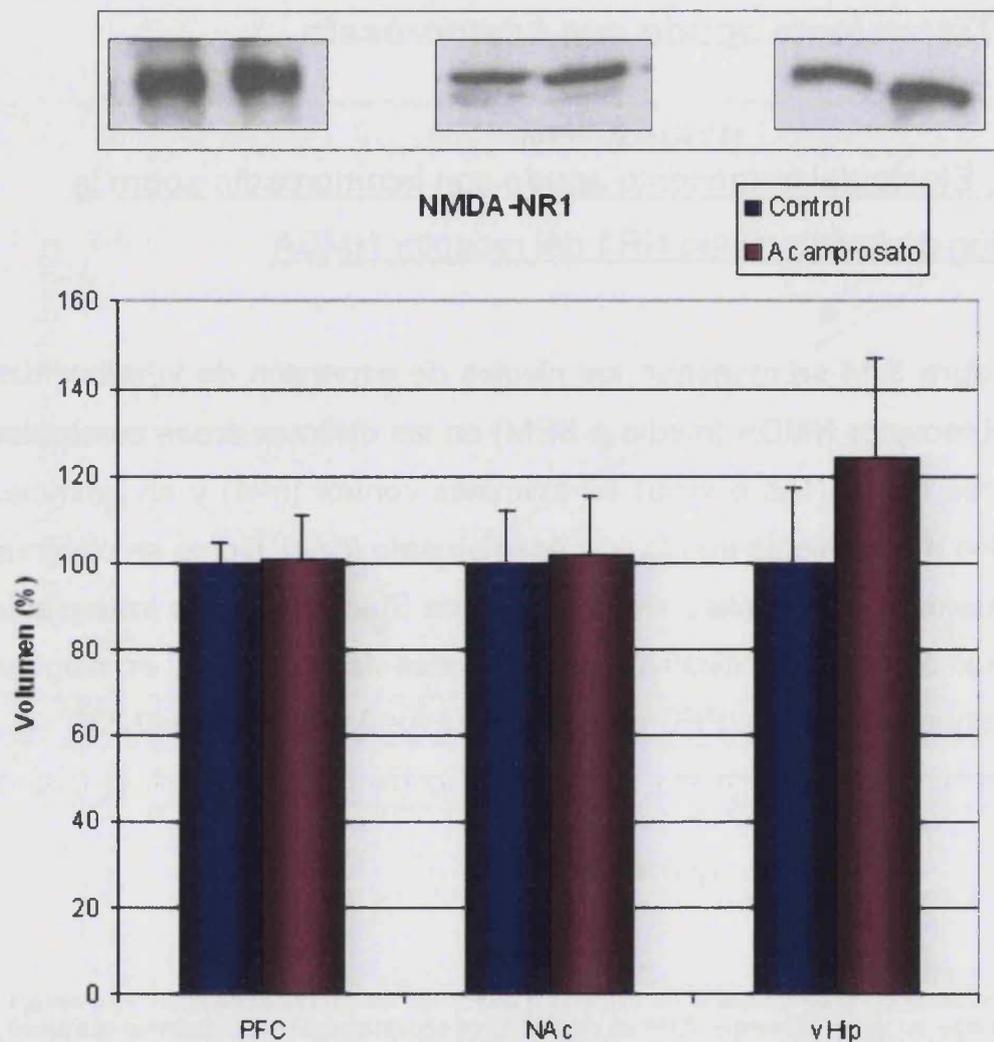


Figura 3.14 Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA. En PFC y NAc los niveles de expresión no se modificaron, mientras que en vHip se detectó un aumento no significativo (*t* de Student) ($n=4$, $125\% \pm 23\%$) ($p=0.33$) respecto a los niveles obtenidos en los animales del grupo control. Valores expresados como porcentaje del valor medio \pm SEM. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los grupos experimentales ordenados del mismo modo que en gráfico.

3.2.2.2. Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA

En la **figura 3.15** se muestran los niveles de expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA en las distintas áreas cerebrales ensayadas (PFC e vHip) en animales control (n=4) y en animales sometidos a tratamiento agudo con acamprosato (n=4). Como se observa, y de acuerdo con el análisis estadístico (t de Student), dicho tratamiento produjo un aumento significativo de la expresión de la subunidad NR2A en PFC ($p=0.037$) mientras que en vHip se detectó una disminución significativa ($p=0.0024$). En NAc no se detectó señal cuantificable de esta subunidad, por lo que no se pudo analizar la variación de la proteína en esta zona del cerebro.

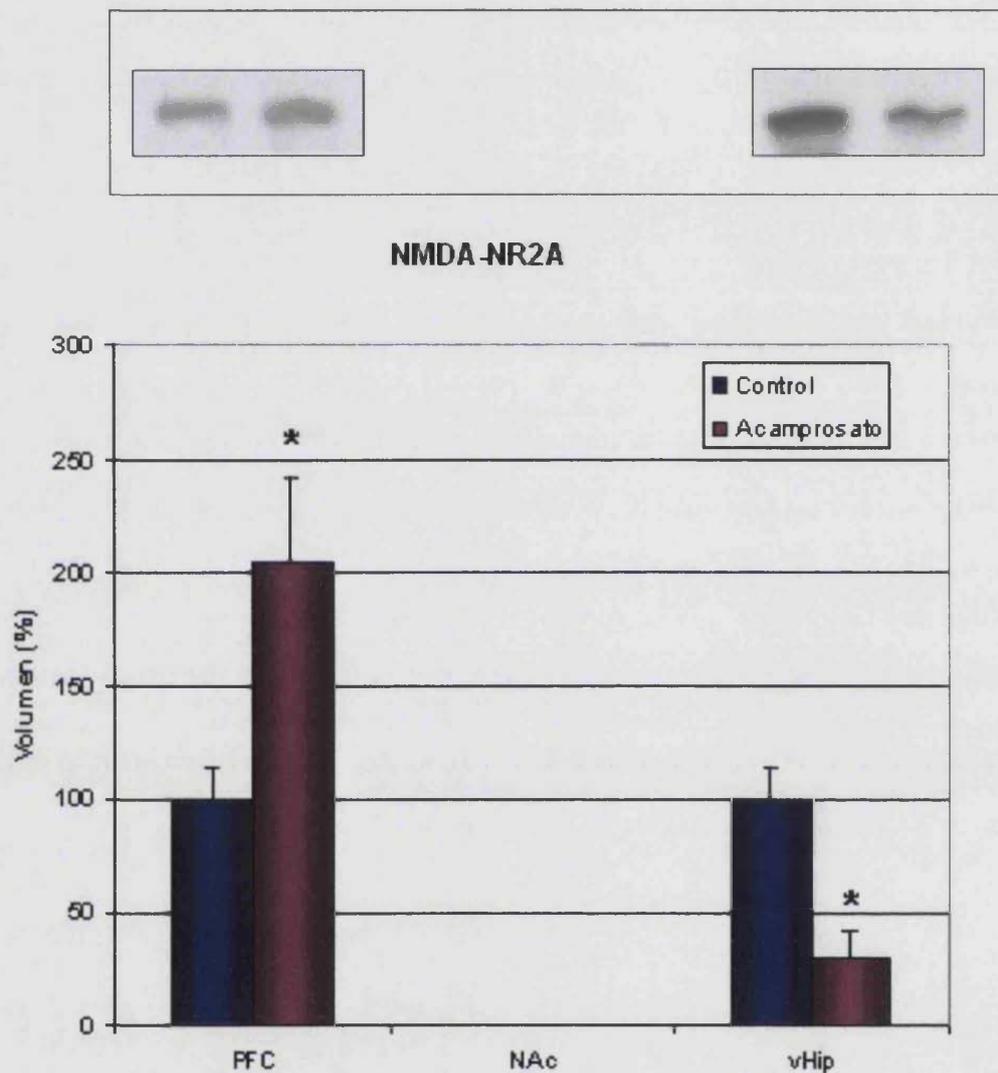


Figura 3.15 Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA. En PFC se detectó un incremento significativo de la expresión ($n=4-5$; $205\% \pm 37\%$) ($p=0.037$) con respecto a los niveles obtenidos en los animales control, mientras que en vHip los niveles disminuyeron significativamente ($n=4-5$; $30\% \pm 12\%$) del nivel observado en animales del grupo control ($p=0.0024$). (*) Indica diferencias significativas respecto al control (t de Student). Valores expresados como porcentaje del valor medio \pm SEM. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los grupos experimentales ordenados del mismo modo que en gráfico.

3.2.2.3. Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA

En la **figura 3.16** se muestran los niveles de expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en las distintas áreas cerebrales ensayadas (PFC, NAc e vHip) en animales control (n=4) y en animales sometidos a tratamiento agudo con acamprosato (n=5). Como se observa, y de acuerdo con el análisis estadístico (t de Student), dicho tratamiento produjo aumento significativo de la expresión de la subunidad NR2B en PFC ($p=0.023$) y en NAc ($p=0.007$) (n= 4-5), mientras que en vHip las diferencias observadas no fueron significativas ($p=0.08$).

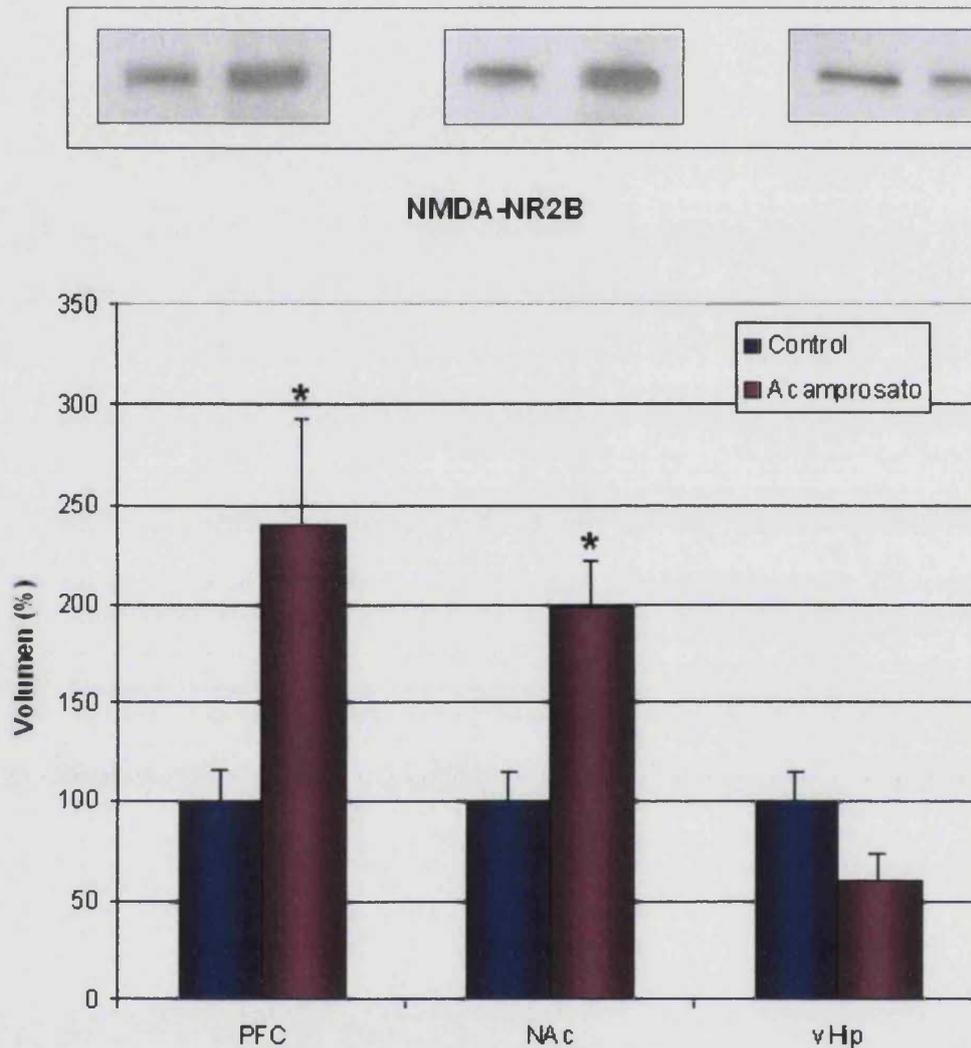


Figura 3.16 Efecto del tratamiento agudo con acamprosato sobre la subunidad NR2B del receptor NMDA. En PFC y NAc se detectó incremento significativo de la expresión de la subunidad ($n=4-5$) ($240\% \pm 54\%$, $p=0.023$ para PFC y $199\% \pm 23\%$, $p=0.007$ para NAc), mientras que en vHip no se detectaron diferencias significativas, a pesar del descenso de los niveles de proteína ($n=4-5$) ($60\% \pm 14\%$, $p=0.08$), sobre el nivel observado en los animales del grupo control. (*) Indica diferencias significativas respecto al grupo control (t de Student). Valores expresados como porcentaje del valor medio \pm SEM. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los grupos experimentales ordenados del mismo modo que en gráfico.

3.2.3. Tratamiento crónico con acamprosato

3.2.3.1 Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA

En la **figura 3.17** se muestran los niveles de expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en las distintas áreas cerebrales ensayadas (PFC, NAc e vHip) en animales control (n=3) y en animales sometidos a tratamiento crónico con acamprosato (n=5). Como se observa, y de acuerdo con el análisis estadístico (t de Student), el tratamiento crónico con acamprosato provocó un aumento significativo de la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en PFC (p=0.0004), NAc (p=0.01) y vHip (p=0.043).

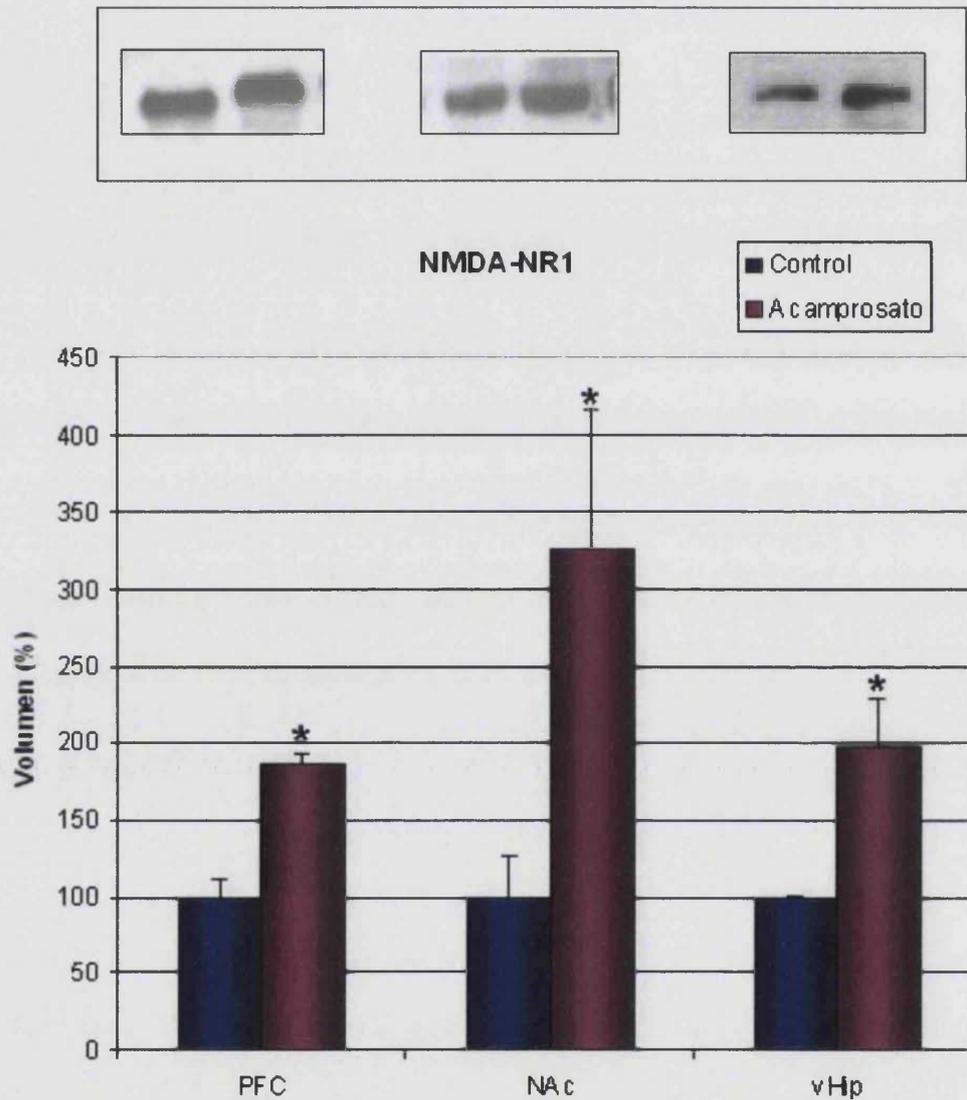


Figura 3.17 Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA. En las tres zonas de estudio se detectó un incremento significativo de la expresión de la proteína. PFC ($187\% \pm 10\%$, $p=0.0004$), NAc ($327\% \pm 90\%$, $p=0.001$) y vHip ($197\% \pm 32\%$, $p=0.043$). (*)Indica diferencias significativas respecto al grupo control. Valores expresados como porcentaje del valor medio \pm SEM. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los grupos experimentales ordenados del mismo modo que en grafico.

3.2.3.2. Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA

En la **figura 3.18** se muestran los niveles de expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA en las distintas áreas del cerebro ensayadas (PFC y vHip) en animales control (n=3) y en animales sometidos a tratamiento crónico con acamprosato (n=5). Como se observa, y de acuerdo con el análisis estadístico (t de Student), dicho tratamiento provocó una disminución no significativa de la expresión de la subunidad en PFC ($p=0.5$) y una disminución significativa en vHip ($p<0.0001$). Al igual que ocurrió en los experimentos correspondientes al tratamiento agudo, en NAc no se detectó señal cuantificable de esta subunidad, por lo que no se pudo analizar la variación de la proteína en esta zona del cerebro.

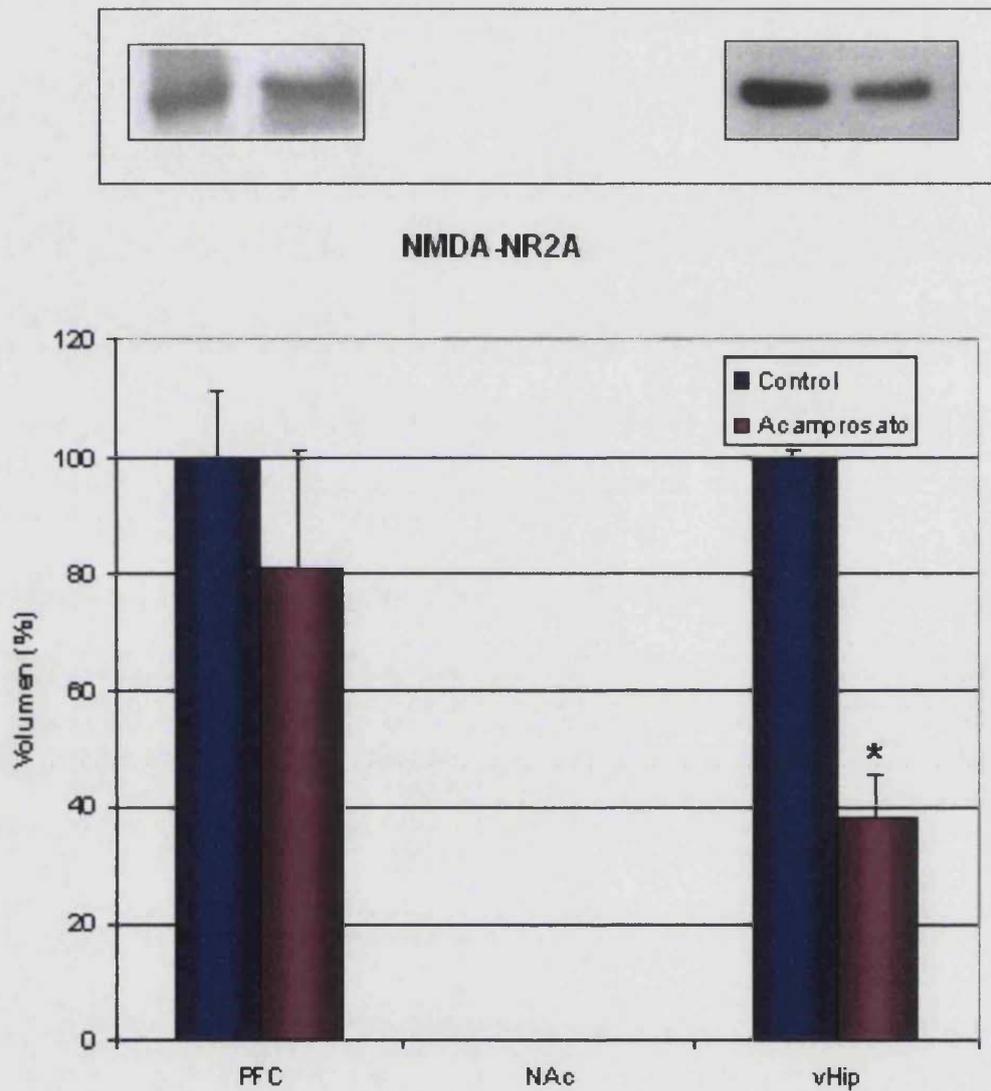


Figura 3.18 Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA. En PFC no se detectaron diferencias significativas, a pesar del descenso de los niveles de proteína ($81\% \pm 20\%$, $p=0.5$) mientras que en vHip se detectó una disminución significativa ($37\% \pm 7\%$, $p<0.0001$) respecto a los niveles obtenidos en los animales del grupo control ($p<0.05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al control. (t de Student). Valores expresados como porcentaje del valor medio \pm SEM. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los grupos experimentales ordenados del mismo modo que en grafico.

3.2.3.3. Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA

En la **figura 3.19** se muestran los niveles de expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en las distintas áreas del cerebro ensayadas en animales control (n=3) y en animales sometidos a tratamiento crónico con acamprosato (n=4). Como se observa, y de acuerdo con el análisis estadístico (t de Student), el tratamiento crónico con acamprosato disminuyó los niveles de expresión de la subunidad del receptor en PFC (p=0.198) y NAc (p=0.44), aunque el análisis estadístico no detectó significación en los cambios observados. Sin embargo, si se detectó un aumento significativo de los niveles de expresión de la subunidad del receptor en vHip (p=0.019).

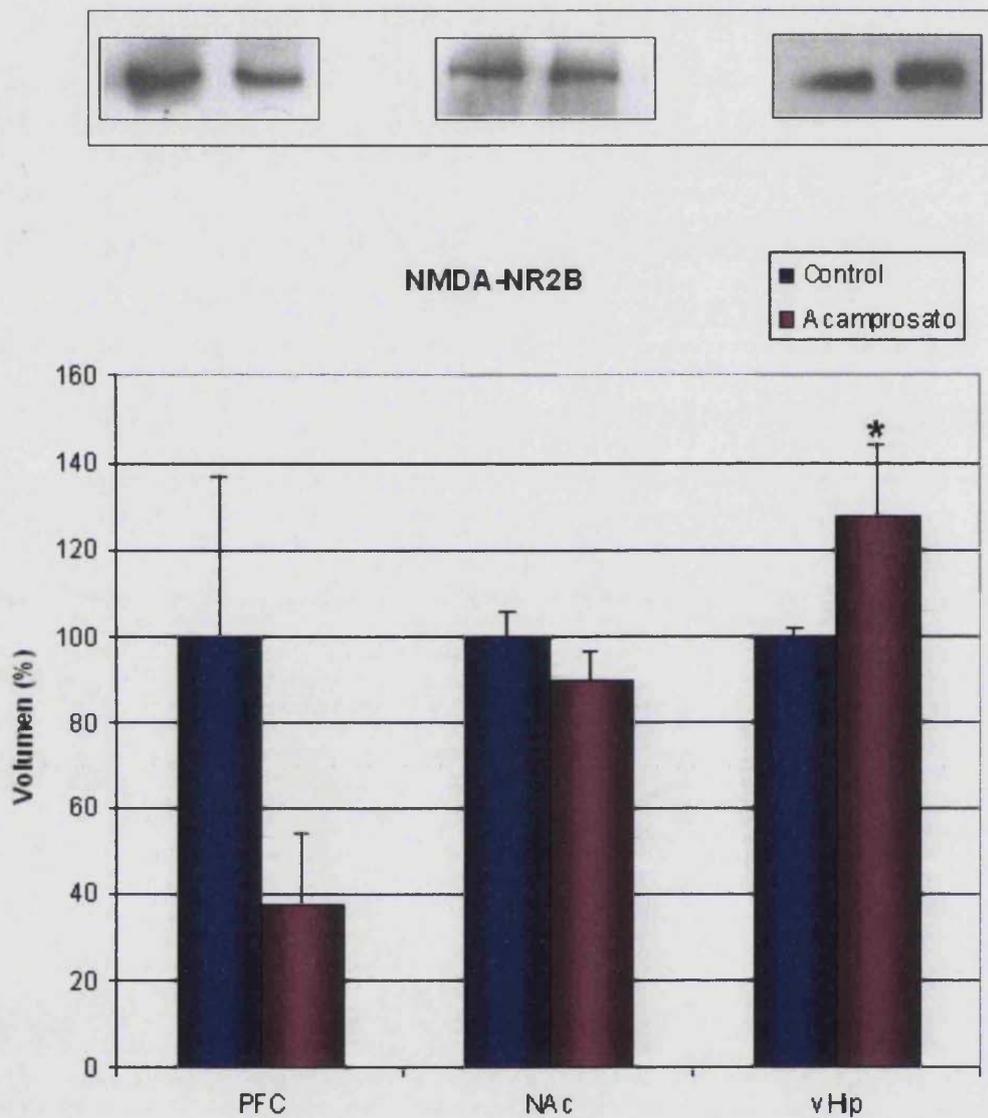
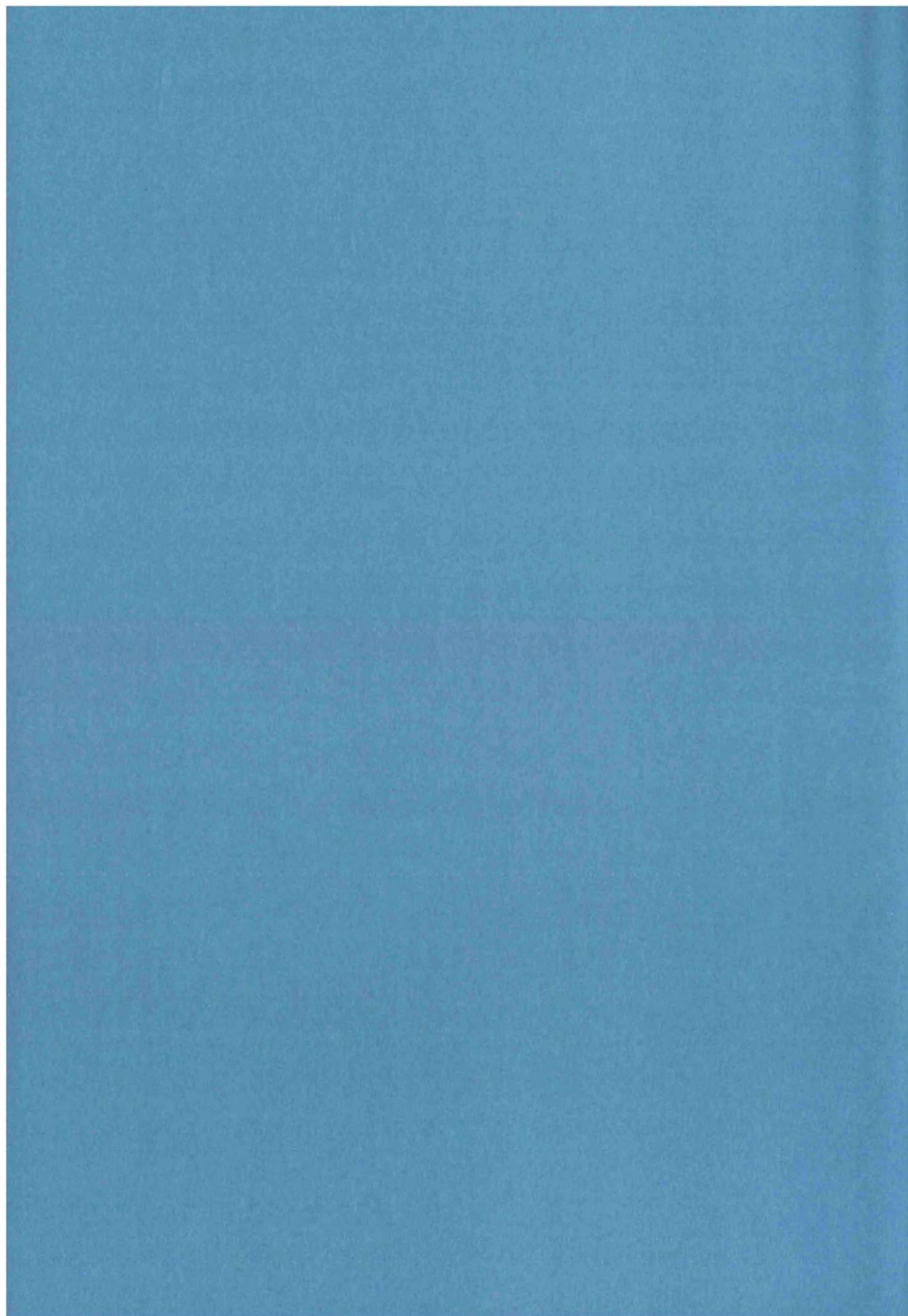


Figura 3.19 Efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la subunidad NR2B del receptor NMDA. En PFC y NAc los niveles de expresión disminuyeron de forma no significativa con respecto al de los animales del grupo control ($37\% \pm 14\%$, $p=0.198$ para PFC y $90\% \pm 6\%$, $p=0.44$ para NAc), mientras que en vHip se detectó un aumento significativo de la expresión de la subunidad del receptor ($128\% \pm 16\%$, $p=0.019$). (*) indica diferencias significativas respecto al control. Valores expresados como porcentaje del valor medio \pm SEM. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los grupos experimentales ordenados del mismo modo que en gráfico.

Capítulo 4:
Discusión



4.1. EXPERIMENTOS DE MICRODIÁLISIS

4.1.1. *Caracterización de la farmacología del acamprosato*

Los datos presentados en el presente estudio sugieren que el acamprosato es capaz de modular la transmisión dopaminérgica en NAc a través de su interacción con los receptores NMDA.

En el primer experimento planteado, el acamprosato se administró mediante retrodiálisis a dosis crecientes (0.05, 0.5 y 5 mM) directamente en NAc, dando como resultado un aumento dosis-dependiente de la liberación de DA en esta región cerebral.

Estos resultados son compatibles con una interacción del acamprosato con los receptores NMDA existentes en NAc para el Glu, hecho éste que apoyaría nuestra hipótesis de trabajo. Sin embargo, por sí solos, estos datos no aportan ninguna información relativa a la naturaleza de la interacción, es decir, a si el acamprosato se comporta como agonista o antagonista de estos receptores. En efecto, numerosos estudios han demostrado que tanto los agonistas (Moghaddam et al, 1990; Moghaddam and Gruen, 1991; Youngren et al, 1993; Segovia et al, 1997) como los antagonistas (Imperato et al, 1990a, 1990b; Youngren et al., 1993; Taber et al, 1996) de los receptores NMDA aplicados directamente en NAc son capaces de provocar un aumento de los niveles extracelulares de DA. Este fenómeno, aparentemente paradójico, se debe a la peculiar organización ultraestructural y funcionamiento del NAc, que a continuación revisaremos en los aspectos necesarios para la adecuada comprensión de nuestros resultados.

En NAc (aunque también en todo el estriado), el principal tipo neuronal lo constituye el grupo de neuronas espinosas gabaérgicas de tamaño medio

(MSN) que proyectan a su vez a otras áreas cerebrales. Este conjunto de neuronas recibe un importante grupo de proyecciones tanto de tipo glutamatérgico (que proviene de distintas estructuras tales como PFC, TL, Amg e vHip; (ver **figura 4.1**) como dopaminérgico (procedente de VTA) (Groenewegen et al, 1991; Meredith, 1999; Sesack et al, 2003; Mora et al, 2007), lo que abre la posibilidad de interacción mutua entre los distintos grupos de proyecciones. La peculiar organización de ambos tipos de aferencias en torno a las MSN es también un aspecto importante a la hora de analizar la interacción entre los sistemas glutamatérgico, dopaminérgico y gabaérgico en NAc. Mientras que parece claro que cualquier neurona MSN recibe aferencias dopaminérgicas, las aferencias glutamatérgicas parecen segregarse en función de la región del estriado ventral (y dorsal) que se considere (Voorn et al 2004), existiendo sin embargo la posibilidad de que en determinadas regiones una misma neurona reciba aferencias glutamatérgicas de dos o incluso tres procedencias distintas. Así, diversos estudios anatómicos y electrofisiológicos han demostrado que algunas neuronas espinosas pueden recibir aferencias glutamatérgicas procedentes de dos regiones distintas (French and Totterdell 2002, 2003) o incluso tres regiones diferentes (Finch, 1996). Por ejemplo, se ha descrito en detalle la convergencia de aferencias, sobre una misma neurona gabaérgica de NAc, procedentes del vHip y de la PFC o de la BLA y el vHip, de modo que la información procesada en cada una de estas regiones al converger en una única neurona espinosa puede ser intergrada en NAc. Se ha sugerido que las proyecciones glutamatérgicas procedentes de Hip establecerían contacto sináptico mayoritariamente sobre las cabezas de las espinas dendríticas localizadas más distalmente, en el arbol dendrítico, mientras que las proyecciones que provienen de Amg establecerían contactos sinápticos en las cabezas de las espinas situadas

en zonas más proximales de las dendritas y en el soma (Mulder et al 1998).

En la **figura 4.1**, se muestra esquemáticamente la estructura y conectividad (sólo la relevante para nuestra explicación) del NAc.

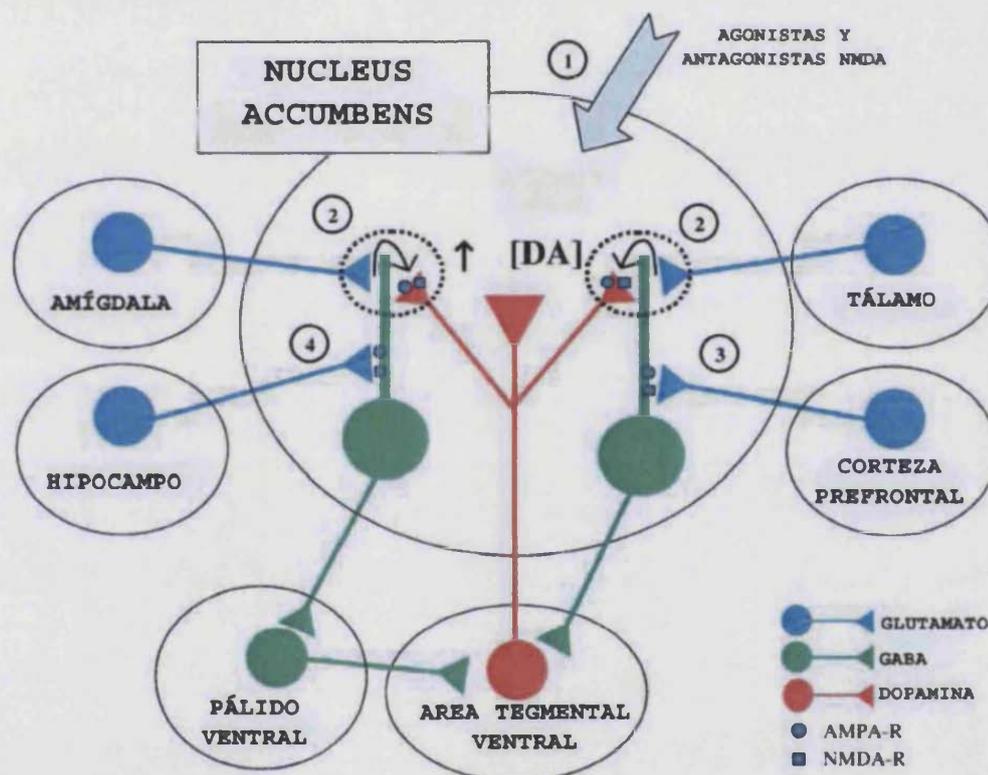


Figura 4.1. Diagrama en el que se muestra la conectividad entre las vías dopaminérgicas (en rojo) gabaérgicas (en verde) y glutamatérgicas (en azul) a nivel del sistema mesolímbico y en especial en el NAc (adaptado de Mora et al, 2007). Con el fin de simplificar el esquema, se han omitido las proyecciones dopaminérgicas que alcanzarían a zonas cercanas a las aferencias procedentes de Hip y PFC.

Las proyecciones dopaminérgicas procedentes de VTA, no parecen establecer sinapsis directamente sobre las terminaciones glutamatérgicas presentes en NAc, ni viceversa. Más bien, establecen contactos sinápticos en el cuello de las espinas dendríticas o directamente en los ejes dendríticos de las MSN (ver **Figura 4.2**). Queda organizada así una

estructura que algunos autores (Mora et al, 2007) han denominado “triada”, que puede dar explicación anatómica a las importantes interacciones a nivel neuroquímico glutamato-dopamina-GABA que controlan, en parte, el funcionamiento del NAc.

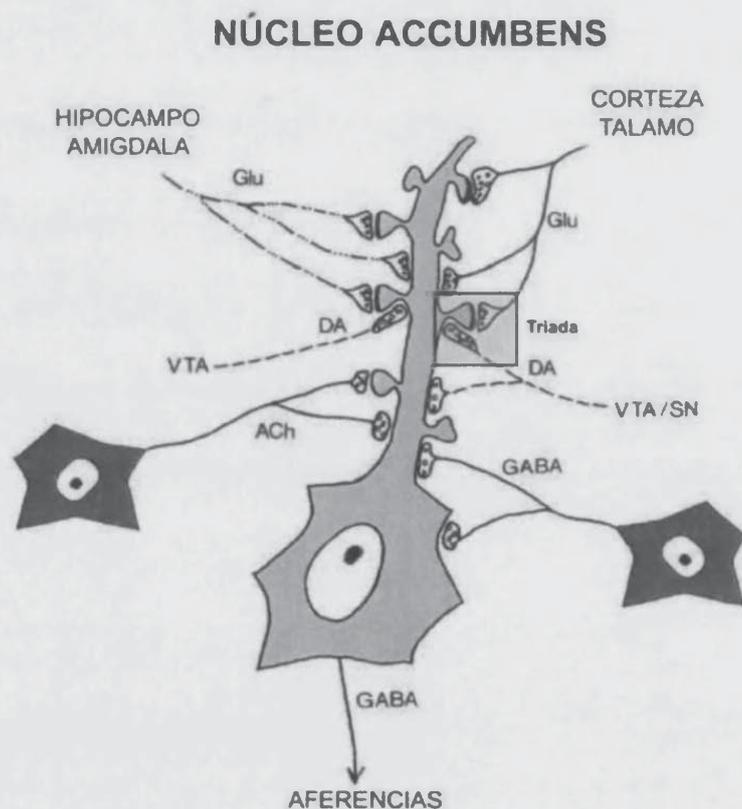


Figura 4.2. Diagrama esquemático de las proyecciones que reciben las MSN de NAc. Los axones glutamatérgicos establecen sinapsis en las cabezas de las espinas dendríticas de las MSN, mientras que los axones dopaminérgicos lo hacen mayoritariamente sobre el cuello o directamente en los ejes dendríticos de las MSN. Aunque parece ser que no existen conexiones directas axoaxónicas entre las terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas, gran parte de las MSN reciben proyecciones de ambos tipos en un área mas o menos cercana, formando lo que algunos autores han denominado “**triada**”. Las proyecciones que provienen de interneuronas GABA y colinérgicas (ACh), suelen establecer sinapsis en las proximidades del soma. Figura modificada de Mora et al, 2007

Se ha descrito la presencia de receptores para glutámico localizados en las terminales axónicas dopaminérgicas así como de receptores dopaminérgicos presinápticos en las terminales glutamatérgicas, de modo que aunque no existen sinapsis propiamente dichas entre las

terminaciones dopaminérgicas y glutamatérgicas, sí existen los receptores que permiten la modulación mutua y directa de la liberación de los respectivos neurotransmisores (Tzschentke, 2001; Wang and Pickel, 2002; Sesack et al, 2003; West et al, 2003). Del mismo modo, en las MSN existen receptores para Glu y DA (Gracy and Pickel, 1996; Chen et al, 1996; Lu et al, 1998) (ver **Figura 4.1**).

Como se indicó anteriormente, un gran número de estudios neurofarmacológicos confirman la capacidad reguladora de las vías glutamatérgicas sobre las terminales dopaminérgicas en NAc. Existen numerosos estudios in vivo en los que se utilizó la técnica de la microdiálisis, que indican que la aplicación exógena de agonistas de los receptores ionotrópicos para el glutamato, en general, y del tipo NMDA, en particular, directamente en NAc, al menos a altas concentraciones, aumenta la liberación de DA en este área cerebral (Imperato et al, 1990a, 1990b; Youngren et al., 1993; Taber et al, 1996). El esquema de la figura 4.1 puede ayudarnos a dar explicación a este fenómeno. Como se aprecia, la activación de los receptores NMDA situados a nivel presináptico en las terminales dopaminérgicas conduciría a la entrada de calcio en los mismos lo que provocaría la liberación de DA al espacio extracelular (ver **2** en **Figura 4.1**). La aplicación de agonistas también provocaría simultáneamente una activación de los receptores NMDA postsinápticos situados en las dendritas de las MSN de NAc. Este hecho, según muestra el circuito de la **Figura 4.1** (ver **4**), implicaría la inhibición de la transmisión desde el VP a VTA, y por tanto, la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas en VTA. La consecuencia sería, de nuevo, el aumento de los niveles de DA en NAc (Blaha et al, 1997; Taepavarapruk et al, 2000; Floresco et al, 2001; Floresco et al, 2003). En la **Figura 4.1** también se aprecia que la activación de los receptores NMDA presentes

en las dendritas de las MSN de NAc que proyectan directamente a VTA, conduciría, sin embargo, a la inhibición de las neuronas dopaminérgicas de VTA y, por tanto, el descenso en la liberación de DA (ver 3 en **Figura 4.1**).

Así pues, dos de las tres interacciones posibles de los agonistas de los receptores NMDA implican un incremento de la liberación de DA en NAc mientras que la tercera, una disminución. Los resultados aportados en esta Memoria (ver experimentos con NMDA y PDC) y los aportados previamente por otros autores demuestran que el efecto neto de la aplicación de los agonistas es el incremento en la liberación de DA.

Otros autores han mostrado que la perfusión local de antagonistas NMDA (y también no NMDA) no reduce, sino que, al igual que ocurre con la aplicación de agonistas, incrementa los niveles extracelulares de DA en NAc (Imperato et al, 1990b; Youngren et al, 1993; Taber and Fibiger, 1995).

En opinión de los autores de estos estudios, la ineficacia de los antagonistas para reducir, o dicho de otro modo, su eficacia para aumentar los niveles de DA en NAc sugiere que los receptores NMDA para el glutámico situados a nivel postsináptico en las MSN de proyección directa, permanecen normalmente activados tónicamente, probablemente por las vías glutamatérgicas procedentes de la PFC. El NAc ejerce así a través de estas MSN de proyección directa un control inhibitorio tónico sobre las neuronas dopaminérgicas de VTA (Sesack and Pickel, 1992; Jackson et al, 2001). Por tanto, cuando los receptores postsinápticos de las MSN de proyección directa son bloqueados por un antagonista NMDA, queda bloqueado o reducido el tono inhibitorio que ejercen sobre VTA, y como consecuencia de este hecho, se desinhiben las neuronas dopaminérgicas en VTA con la consiguiente liberación de DA en NAc.

Así pues, las elevaciones que el acamprosato ocasiona en la DA tras su perfusión localizada en NAc podrían ser compatibles con dos posibilidades:

- el acamprosato se comporta como un agonista de los receptores ionotrópicos para el glutámico o,
- el acamprosato es un antagonista de dichos receptores.

En el siguiente grupo de experimentos se intentó dar respuesta a esta disyuntiva. Para ello se perfundieron mediante retrodiálisis en NAc, por un lado, el agonista puro del receptor ionotrópico del tipo NMDA, es decir, el N-metil-D-aspartato (NMDA) a las concentraciones 25 y 500 μM y, por otro lado, en un grupo experimental diferente, el inhibidor de la recaptación intraneuronal del Glu, PDC, a la concentración de 0.5 mM, en ausencia y presencia de acamprosato 0.05 mM con el fin de analizar si el acamprosato presenta capacidad real para atenuar (lo que indicaría una acción antagonista o agonista parcial) o, alternativamente, para aumentar (lo que indicaría una acción agonista pura) los efectos que estos compuestos tuvieron sobre el aumento en los niveles de DA en NAc.

La dosis de acamprosato seleccionada para estos experimentos, fue la más baja de todas las ensayadas en los experimentos anteriores y que, como se recordará, no produjo una alteración significativa de la DA en nuestra curva dosis-respuesta.

Nuestros resultados muestran claramente que el acamprosato es capaz de atenuar los aumentos en la liberación de DA inducidos por el propio NMDA, en un caso por debajo de niveles basales, cuando se coperfundió junto con la dosis más baja de NMDA (25 μM), y en otro, de atenuar significativamente el brusco aumento de DA que provocaba la perfusión de la dosis más elevada de NMDA (500 μM).

Cuando en lugar de un agonista exógeno se empleó el PDC con el objeto de aumentar los niveles endógenos de Glu en NAc, el acamprosato, de nuevo, fue capaz de atenuar significativamente los efectos de esta sustancia sobre los niveles de DA. Así, el acamprosato, no sólo fue capaz de bloquear completamente el aumento de la liberación de DA en NAc provocada por PDC, sino que causó una disminución significativa de los niveles de DA en NAc respecto del nivel basal. A día de hoy, no disponemos de una explicación para estas disminuciones tardías de los niveles de DA por debajo del nivel basal; tal vez se deban a reajustes en la actividad de los circuitos involucrados en el mantenimiento del nivel basal de DA en NAc. Pero, en nuestra opinión estos resultados permiten concluir que:

- el acamprosato probablemente ejerce sus efectos sobre los niveles de DA en NAc a través de su interacción con los receptores NMDA, y
- el acamprosato no actúa como agonista puro de dichos receptores sino más bien como agonista parcial o antagonista

Con el fin de aclarar si el acamprosato actúa como agonista parcial o antagonista del receptor NMDA, se perfundió acamprosato a la concentración de 0.5 mM en presencia y ausencia de AP5 con el fin de comprobar la acción del acamprosato sobre la liberación de DA en presencia de un antagonista selectivo del receptor NMDA. La idea rectora en este experimento fue la siguiente: si el acamprosato y el AP5 comparten el mismo mecanismo de acción, es decir, una acción antagonista sobre el receptor NMDA, los efectos sobre la liberación de DA en NAc deberían al menos ser aditivos. Si por el contrario el acamprosato

actúa como un agonista parcial, su perfusión en presencia de niveles adecuados de AP5 conducirá a una reducción de los efectos observados con la perfusión única de acamprosato.

Para la realización de estos experimentos, se seleccionó la concentración intermedia de acamprosato (0.5mM), capaz de producir un aumento moderado en los niveles de DA, lo que daría margen para la detección de la adición de efectos y, al tiempo, permitiría analizar posibles reducciones en los efectos. Por otro lado la concentración utilizada de AP5 se seleccionó en base a experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (datos no mostrados) que demostraron que esa concentración estaba por debajo del umbral de concentración requerida para producir un aumento significativo de la DA en NAc.

Nuestros resultados muestran que cuando el acamprosato fue perfundido en solitario provocó un aumento máximo del 141% sobre los niveles basales de DA, mientras que en presencia de AP5, el aumento de DA extracelular fue del 168%. Por tanto, a priori, estos experimentos parecen descartar la hipótesis de que el acamprosato actúe como un agonista parcial del receptor NMDA y señalan que más bien se comporta como un antagonista débil de dicho receptor.

4.1.2. Efecto del acamprosato sobre el incremento de DA extracelular causado por una estimulación del Hipocampo ventral (vHip).

En el siguiente grupo de experimentos nos planteamos la posibilidad de comprobar la capacidad antagonista del acamprosato sobre los receptores NMDA mediante otro enfoque experimental. La premisa que guió estos experimentos fue la siguiente: si el acamprosato se comporta como un antagonista de los receptores NMDA, su aplicación localizada en el NAc debe ser capaz de atenuar o bloquear los incrementos de DA derivados de la estimulación eléctrica o química de cualquiera de las aferencias glutamatérgicas al NAc. Para llevar a cabo este grupo de experimentos, decidimos seleccionar la proyección vHip-NAc por conocerse ampliamente las consecuencias, a nivel comportamental y neuroquímico, de su estimulación y por haber sido recientemente implicada en el fenómeno de la recaída en conductas adictivas en modelos animales. Dos grupos de trabajo independientes han mostrado que las recaídas en el consumo de drogas de abuso podía iniciarse por la activación de la vía vHip-NAc (Vorel et al, 2001; Taepavarapruk and Phillips, 2003).

El NAc recibe una importante inervación glutamatérgica procedente del vHip (Walaas, 1981; Groenewegen et al, 1987; Christie et al, 1987; Fuller et al, 1987; Totterdell and Smith, 1989; Sesack and Pickel, 1990). Numerosos estudios neuroquímicos han mostrado que los niveles de DA en NAc pueden ser influenciados en gran parte por la actividad de estas proyecciones procedentes de vHip. Así, la estimulación química del vHip (mediante infusiones de NMDA) (Brudzynski and Gibson 1997; Legault

and Wise, 1999; Legault et al, 2000; Floresco et al, 2001) o su estimulación eléctrica (Blaha et al, 1997; Taepavarapruk et al, 2000) inducen fuertes y persistentes aumentos de DA en NAc que coinciden temporalmente con una intensa activación locomotora.

Se han planteado dos hipótesis no excluyentes para explicar este fenómeno. Así, algunos autores (Blaha et al, 1997; Taepavarapruk et al, 2000) postulan que la estimulación del vHip produce un aumento en la liberación de DA en NAc merced a la acción del glutamato liberado sobre los iGlu que se localizan en las terminaciones dopaminérgicas en NAc. Otros autores, postulan que el aumento de DA es el resultado de la activación de los receptores situados a nivel de las neuronas dopaminérgicas de VTA pues la aplicación localizada en esta zona de tetrodotoxina o de antagonistas de amplio espectro de los receptores ionotrópicos del glutamato es capaz de suprimir, el aumento de los niveles de DA extracelular causados por la estimulación del vHip (Legault and Wise, 1999; Legault et al, 2000; Floresco et al, 2001).

Los resultados de nuestros experimentos están en plena concordancia con lo publicado hasta el momento, es decir, la estimulación química del vHip (a través de la aplicación de NMDA 5 mM) es capaz de producir un incremento significativo en los niveles extracelulares de DA en NAc (ipsilateral) de $143 \pm 8\%$ 60 min después de finalizar la administración de NMDA y con una duración del efecto de al menos 2 horas. Nuestros resultados muestran además que la perfusión de 0.05 mM de acamprosato en NAc antes, durante y tras finalizar la estimulación del vHip es capaz de atenuar casi completamente el incremento de los niveles de DA provocados por el NMDA en vHip. Este último dato confirma la participación de los receptores NMDA para el Glu existentes en las terminaciones dopaminérgicas en NAc en la génesis de estos

efectos, tal y como señalan otros autores (Blaha et al, 1997; Taepavarapruk et al, 2000). Sin embargo, el hecho de que la atenuación de los efectos de la estimulación química por el acamprosato no haya sido completa, pudiera indicarnos que, o bien la dosis de acamprosato no ha sido suficiente, o que los receptores iGlu situados a nivel de las neuronas dopaminérgicas de VTA también participan activamente en los incrementos en los niveles de DA en NAc, tal y como proponen Legault et al, 2000 y Floresco et al, 2001. En cualquier caso nuestros resultados parecen confirmar de nuevo que el acamprosato podría ejercer sus efectos bloqueando los receptores NMDA para el Glu.

4.1.3. Efecto de la perfusión local de acamprosato en VTA sobre los niveles extracelulares de DA en NAc.

Puesto que los resultados obtenidos en los anteriores experimentos indicaban que el acamprosato podría actuar como un antagonista débil de los receptores NMDA modulando la liberación de DA en NAc, se diseñó el presente bloque de experimentos en el que se perfundió acamprosato a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 5 mM) directamente en VTA, con objeto de cuantificar sus efectos sobre la actividad del sistema mesolímbico a través de la medición de los niveles de DA extracelular en NAc. Este punto es de especial interés, pues como a continuación se detallará, existe una importante controversia en relación con los efectos que los antagonistas de los receptores ionotrópicos para el glutamato (NMDA y AMPA/kainato) poseen sobre la actividad del sistema mesolímbico cuando se aplican a nivel del VTA.

Las acciones de los antagonistas de los receptores NMDA (y no NMDA, es decir del tipo AMPA/kainato) perfundidos mediante retrodiálisis o

administrados localmente mediante microinyección en VTA sobre los niveles de DA en NAc han sido estudiadas por diferentes autores con resultados no del todo coincidentes.

Existe una abundante bibliografía procedente del ámbito de la electrofisiología y la neuroquímica que parece confirmar la importancia de las aferencias glutamatérgicas en la regulación basal de la actividad de las neuronas localizadas en el VTA. Una de las principales aferencias glutamatérgicas al VTA procede de la PFC (Christie et al., 1985; Sesack et al., 1989; Hurley et al., 1991; Sesack and Pickel, 1992; Lu et al., 1997). Es por ello que la mayor parte de los autores que se han centrado en el estudio del efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores iGlu aplicados sobre VTA sobre los niveles de DA en NAc, han abordado en sus experimentos la estimulación o la inactivación de esta proyección.

Numerosos autores han encontrado que la estimulación eléctrica o química de la PFC incrementa la actividad de las neuronas dopaminérgicas en VTA (Gariano and Groves, 1988; Murase et al., 1993; Tong et al., 1996; Taber and Fibiger 1995; Karreman and Moghaddam 1996; You et al., 1998), mientras que su inactivación produce los efectos opuestos (Svensson and Tung, 1989; Murase et al., 1993). Los resultados de los estudios que han recurrido a lesiones de la PFC (Jaskiw et al. 1990) o a su inactivación química (Murase et al. 1993; Karreman and Moghaddam 1996; Louilot et al. 1989; Kolachana et al. 1995) como herramientas de trabajo, tienden a confirmar el papel excitatorio tónico de la proyección PFC→VTA, aunque algunos autores han criticado la relevancia de tales estudios (Jackson et al., 2001).

Precisamente estos autores, empleando frecuencias de estimulación significativamente inferiores a las empleadas en los estudios arriba citados, hallaron que la estimulación eléctrica de la PFC reducía significativamente los niveles de DA en NAc (Jackson et al., 2001).

Además el mismo grupo de investigadores pudo demostrar que la estimulación eléctrica de la PFC era capaz de impedir los incrementos en los niveles de DA en NAc ocasionados por la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral, lo que parece indicar que la PFC ejerce un control inhibitorio sobre la liberación de DA (Jackson and Moghaddam, 2001). Como explicación a sus hallazgos estos autores propusieron dos hipótesis alternativas. La primera asumía que la estimulación eléctrica en la PFC activaría la vía corticoestriatal que conduciría a la activación de las neuronas GABAérgicas que proyectan sobre el VTA, lo que ocasionaría la inhibición de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesoaccumbens. La segunda hipótesis asume que la estimulación eléctrica de la PFC activaría las neuronas de proyección que establecen sinapsis con neuronas GABAérgicas (de proyección hacia NAc, así como interneuronas) en VTA, las cuales inhibirían localmente a las neuronas dopaminérgicas en esta zona (Carr and Sesack 2000). En concordancia con estos últimos resultados, Takahata y Moghaddam (2000) mostraron que el bloqueo farmacológico de la actividad glutamatérgica mediada a través de receptores del tipo AMPA/kainato a nivel de VTA conducía a un aumento de los niveles de DA en NAc, contrariamente a lo ocurrido a nivel de PFC en donde disminuían. Estos resultados implicarían la existencia de un control tónico inhibitorio de la actividad de la vía mesoaccumbens mediado a través de estos receptores.

El escenario, sin embargo, parece lejos de estar aclarado, ya que diversos estudios (Westerink et al, 1996) empleando la microdiálisis como herramienta de trabajo, han mostrado que la administración localizada en VTA de kainato o de NMDA, conduce a elevaciones significativas en los niveles de DA en NAc. La aplicación de un antagonista selectivo de los receptores AMPA/kainato, el CNQX, no redujo significativamente los niveles de DA en NAc (aunque a la dosis seleccionada, los efectos

tendieron hacia una disminución clara de los niveles de DA en NAc). Así pues, estos autores no abogan por la existencia de un efecto estimulador tónico mediado por estos receptores. Algo similar ocurre con el antagonista no competitivo de los receptores del tipo NMDA, MK-801. Su administración localizada, aunque no reduce significativamente los niveles de DA en NAc, sí da lugar a cambios en los niveles de DA claramente tendentes a la reducción. Esta falta de significación estadística no permitió a Westerink y cols. apoyar la existencia de una acción estimuladora tónica mediada por receptores iGlu. Tal vez el empleo de dosis más elevadas de estos antagonistas, hubiera permitido a los autores analizar más en detalle esta posibilidad.

Otros autores han estudiado también los efectos de la aplicación localizada en VTA de antagonistas de los receptores NMDA con resultados más claros. Así, Karreman y cols, (1996), perfundieron AP5 (un antagonista selectivo de estos receptores) directamente en VTA, y pudieron comprobar que a las concentraciones ensayadas (100 y 500 μM), el AP5 fue capaz de reducir de modo dosis-dependiente la DA en NAc, sugiriendo, que la liberación de DA en NAc estaría bajo control tónico a través de estos receptores. Curiosamente este grupo no detectó cambios significativos en los niveles de DA en NAc cuando se perfundió CNQX, que como vimos antes tuvo una tendencia, aunque no significativa, a reducir los niveles de DA en NAc (Westerink et al 1996).

En línea con estos resultados, Kretschmer (1999) encontró que la administración mediante retrodiálisis de AP5 (200 μM) directamente en VTA producía una disminución del 50 % en los niveles de DA en NAc.

Así pues, encontramos en la bibliografía dos tendencias contrapuestas. Por un lado, existen pruebas que parecen indicar que las aferencias glutamatérgicas a VTA ejercen, a través de los receptores iGlu (en especial los receptores del tipo NMDA), un control excitatorio tónico,

aunque por otro lado, existen evidencias que apuntan en la dirección contraria, es decir, que las vías glutamatérgicas inhibirían tónicamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesoaccumbens. Ante este panorama, resulta difícil dar una explicación taxativa a nuestros resultados con el acamprosato, que, como se mostró anteriormente, se comporta como un antagonista de los receptores del tipo NMDA.

Nuestros datos experimentales no permiten apoyar taxativamente ninguna de las dos tendencias arriba comentadas. Así, los resultados obtenidos tras perfundir la dosis más baja de acamprosato (0.1 mM) en VTA, apoyan la idea propuesta por el grupo de Moghaddam sobre la existencia de un control inhibitorio tónico mediado por las aferencias glutamatérgicas de la PFC. Sin embargo, la reducida magnitud del cambio detectado (en torno a un 12 % sobre la línea base), a pesar de la significación estadística, indican una escasa influencia (si es que no es artefactual) de este proceso en la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesoaccumbens.

El incremento en las dosis de acamprosato perfundidas, sorprendentemente, cambió la tendencia de los efectos observados. La dosis intermedia de acamprosato (0.5 mM) no indujo cambios significativos en los niveles de DA en NAc, mientras que la mayor de las dosis ensayadas (5 mM) redujo significativamente los niveles de DA en NAc, apoyando, por tanto, la existencia de un control excitatorio tónico mediado a través de los receptores NMDA. La magnitud de las reducciones producidas fueron también moderadas (no superaron el 19% de reducción respecto a los niveles basales) y generan en nuestra opinión ciertas dudas en relación con su relevancia fisiológica.

Ante estos datos, cabe preguntarse si la organización anatómica descrita hasta el momento para las aferencias glutamatérgicas al VTA (derivada fundamentalmente de los estudios del grupo de Susan Sesack) permite

plantearse la posibilidad de un efecto dual de los antagonistas de los receptores iGlu sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la proyección mesoaccumbens. Se ha de indicar que a día de hoy todavía no se conocen completamente todas las regiones cerebrales que aportan aferencias glutamatérgicas al VTA (Omelchenko and Sesack 2007). Tan sólo existen evidencias claras para la PFC antes comentada y para el tegmento laterodorsal (LDT) del tegmento mesopontino (Charara et al 1996; Forster and Blaha 2000). Estudios recientes indican que las neuronas dopaminérgicas mesoaccumbens reciben aferencias glutamatérgicas directas desde el LDT. Esta proyección es selectiva y no afecta a las neuronas mesoaccumbens gabaérgicas (Omelchenko and Sesack 2005). Por el contrario, las aferencias glutamatérgicas de la PFC alcanzan fundamentalmente a las neuronas mesoaccumbens gabaérgicas y a interneuronas locales gabaérgicas que pueden controlar, indirecta o directamente, la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Carr and Sesack 2000) (ver **Figura 4.3**)

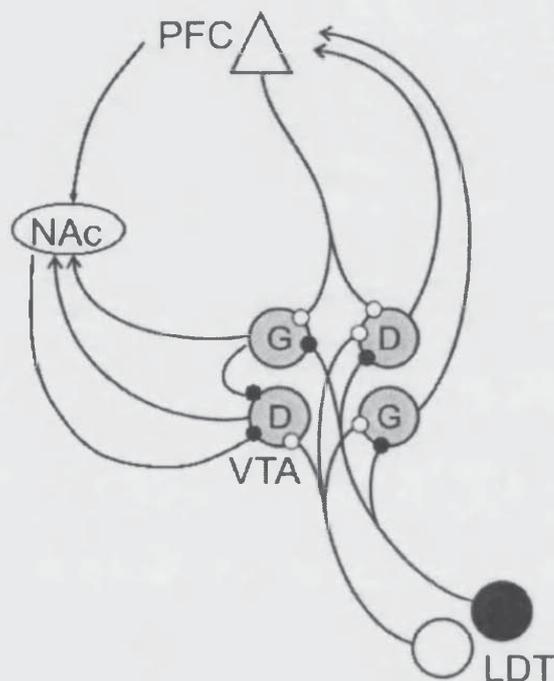


Figura 4.3. Disposición hipotética de las principales aferencias y eferencias en VTA. Las vías inhibitorias se han marcado en círculos negros, mientras que las excitatorias se han marcado en blanco. Como se observa, la proyección desde LDT a las neuronas dopaminérgicas mesoaccumbens de VTA viaja directamente hacia NAc. Figura modificada de Omelchenko and Sesack (2005).

Ante esta disposición estructural, podría hipotetizarse que el acamprosato perfundido a bajas dosis hubiera afectado en mayor proporción los receptores NMDA ubicados sobre las neuronas gabaérgicas mesoaccumbens y/o las interneuronas gabaérgicas locales, que al perder el input excitatorio disminuirían su control inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas mesoaccumbens lo que daría lugar a una desinhibición de las mismas. A concentraciones de acamprosato más elevadas, no sólo se afectaría la actividad de las neuronas gabaérgicas, sino que el bloqueo generado por el acamprosato se extendería también a los receptores NMDA ubicados en las propias neuronas dopaminérgicas que reciben las proyecciones procedentes de al menos el LDT. El efecto neto, en este segundo caso, resultaría en una inhibición de la actividad de las neuronas

dopaminérgicas y una reducción consiguiente en los niveles de DA registrados en NAc.

Somos conscientes de que aunque nuestros datos se ajustan a esta interpretación, las evidencias aportadas son todavía débiles. Es muy posible que nuestro diseño experimental haya sido inadecuado para detectar de un modo más firme los cambios (si es que existen) en la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la proyección mesoaccumbens debidos a la perfusión localizada de un antagonista NMDA como el acamprosato. Probablemente habría sido más adecuado efectuar perfusiones del fármaco, prolongadas en el tiempo (por ejemplo, 120 min en lugar de los 40 min utilizados), con objeto de definir correctamente y sin sombra de duda, los efectos sobre la liberación de DA en NAc. También el empleo de administraciones mediante retrodiálisis de AP5 u otros antagonistas de los receptores NMDA para el Glu habría ayudado a analizar con más detalle este aspecto de la neurofarmacología del sistema dopaminérgico mesoaccumbens.

Resumiendo, el acamprosato mostró un efecto contrapuesto sobre la actividad de las neuronas mesoaccumbens dopaminérgicas al ser perfundido a diferentes dosis en el VTA. En nuestra opinión los resultados obtenidos no han sido concluyentes, pudiendo deberse este hecho a déficits en el diseño experimental que imposibilitaron un análisis claro de los efectos del antagonista.

4.2. EFECTO DEL ACAMPROSATO EN LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DEL RECEPTOR NMDA EN DISTINTAS AREAS CEREBRALES

Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción del acamprosato, y en base a una serie de estudios previos (Rammes et al, 2001) que sugieren la posibilidad de que éste fármaco, actúe modulando la expresión de ciertas subunidades que componen el receptor NMDA en regiones específicas del cerebro, se llevaron a cabo una serie de experimentos adicionales. En ellos se analizó el efecto, tanto de la administración aguda como crónica del fármaco en estudio, sobre la expresión de ciertas subunidades del receptor NMDA (NR1, NR2A y NR2B) en tres regiones cerebrales claramente implicadas en el fenómeno de la recaída observado en la dependencia alcohólica: la PFC, el NAc y el vHip. Estos experimentos presentan la novedad, respecto a los ya publicados, del análisis del efecto crónico del acamprosato, lo cual resulta interesante desde un punto de vista clínico ya que el tratamiento con este fármaco es de larga duración (al menos 1 año). Además se estudia, por primera vez, el efecto del acamprosato sobre una zona cerebral, el NAc, y una subunidad, la NR2A, claramente implicadas en la dependencia alcohólica (Crews et al, 1996; Krystal et al, 2003).

Nuestros resultados sugieren que el acamprosato es capaz de modular la expresión de las subunidades estudiadas, tanto a corto (de forma rápida, tratamiento agudo) como a largo plazo (tratamiento crónico), de forma selectiva y región-dependiente, apoyando y ampliando la hipótesis propuesta inicialmente por Rammes y su equipo investigador (2001). Adicionalmente, este comportamiento, similar al observado con reconocidos antagonistas NMDA, daría soporte a los anteriores resultados

presentados en esta Memoria y que postulan la capacidad antagonista de los receptores NMDA del acamprosato.

Los receptores NMDA, actualmente son considerados como una de las principales "dianas" o lugares de acción del etanol (Guerra, 2000; Krystal et al, 2003; Ren et al, 2008) y están directamente implicados en la plasticidad neural (Dingledine et al, 1999; Riedel et al, 2003; Albeni, 2007; Gass and Olive, 2008). Se trata de proteínas complejas hetero tetraméricas formadas por al menos una subunidad NR1, y una combinación de las subunidades NR2A-D y NR3A o 3B (Gass and Olive, 2008). La composición en subunidades del receptor está regulada ontogénicamente y es neuroanatómicamente diferente.

La **subunidad NR1** debe estar presente en todos los complejos para que los receptores NMDA sean funcionalmente activos (Crews et al, 1996; Cull-candy et al, 2001; Albeni, 2007; Chen and Roche, 2007) y contiene un sitio de unión a la Gly. Actualmente se conocen 8 variantes, (splice variants, en término anglosajón) de esta subunidad, aunque todas ellas están codificadas por el mismo gen. Algunos autores postulan que esta subunidad podría interaccionar con el etanol a través del dominio M3 (Ronald et al, 2001; Krystal et al, 2003). Esta subunidad está ampliamente distribuida por todas las zonas cerebrales (Crews et al, 1996; Dingledine et al, 1999; Cull-Candy et al, 2001).

La **subunidad NR2** posee un sitio de unión para el Glu, y ha sido clasificada en 4 subtipos en base a que puede ser codificada por 4 genes distintos, nombrados como 2A, 2B, 2C y 2D. Estos subtipos poseen distinta distribución regional y diferencias funcionales. Las subunidades 2A y 2B han sido directamente implicadas en el desarrollo de la dependencia alcohólica (Crews et al, 1996; Fadda and Rossetti, 1998;

Krystal et al, 2003). Diversos autores han señalado que los tetrámeros compuestos por los monómeros NR1, NR2A y NR2B son mucho más sensibles a la acción del etanol (Buller et al, 1995; Lovinger, 1996; Crews et al, 1996). Por ello, además de las subunidades NR1 y NR2B ensayadas previamente por Rammes y cols (2001), en nuestro estudio del efecto del acamprosato sobre la expresión del receptor NMDA, también se incluyó la subunidad NR2A. De acuerdo con estudios recientes, la sensibilidad del receptor NMDA al etanol podría modularse mediante la interacción del etanol con unos residuos de aminoácidos específicos situados en los dominios M3 y M4 localizados en la subunidad NR2A del receptor (Ren et al, 2008). En cuanto a su distribución, las subunidades NR2A y 2B se han localizado preferentemente en todo el prosencéfalo, incluidos estriado, Hip y PFC (Monyer et al, 1994; Kalluri et al, 1998). Algunos autores, han postulado que las MSN de NAc expresan ambas subunidades, aunque en mayor medida la subunidad NR2B (Landwehrmeyer et al, 1995; Martin et al, 2004).

La **subunidad NR3** fue aislada hace unos años. En la actualidad se conocen dos subtipos de esta subunidad (3A y 3B) (Cull-candy et al, 2001; Krystal et al, 2003; Albenzi, 2007). Las propiedades que confiere la presencia de esta subunidad al receptor son todavía objeto de debate, aunque algunos autores, mediante experimentos con receptores NMDA recombinantes, han demostrado que la presencia de dicha subunidad, no parece determinante para la mayor o menor sensibilidad del receptor al etanol (Smothers and Woodward, 2003).

Parece que el etanol ejerce sobre el receptor NMDA distintos efectos. Administrado de manera aguda inhibe la función del receptor a través de un mecanismo no competitivo e induce la fosforilación y la internalización de las subunidades NR2 (Wang et al, 2007). Esta inhibición se observa en

zonas concretas del cerebro, entre las que se encuentran todo el cortex cerebral (Hoffman et al, 1990), el Hip (Randoll et al, 1996) y el NAc (Nie et al, 1994). Cuando se administra el etanol de manera crónica, parece producirse una inducción de la expresión de varias subunidades del receptor NMDA (Follesa and Ticku, 1996b; Kalluri et al, 1998; Chandler et al, 1999; Nagy et al, 2003). Se postula que esta inducción podría ser debida a una respuesta adaptativa del tejido a la presencia de etanol y su acción antagonista sobre el receptor NMDA. Es importante señalar también que, como posteriormente se comentará más ampliamente, varios estudios han demostrado que la administración crónica de antagonistas NMDA provoca cambios importantes en la expresión de las subunidades que conforman dicho receptor (Williams y cols, 1992; Follesa and Ticku, 1996a y b; Anastasio and Johnson, 2008).

4.2.1. Tratamiento agudo con acamprosato

Los resultados obtenidos en la presente Memoria aparecen reunidos en el cuadro 4.1. :

	PFC	NAc	vHip
NR1	101%	102%	125%
NR2A	205% ^a	—	30% ^a
NR2B	240% ^a	199% ^a	60%

Cuadro 4.1. Niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B tras el tratamiento agudo con acamprosato en las tres zonas cerebrales ensayadas (PFC, NAc, vHip). Los valores se expresan en porcentaje con respecto al control. (a) Indica diferencias significativas respecto al valor control (t-Student; p<0.05)

Como se observa, el tratamiento agudo con acamprosato no alteró los niveles de expresión de la **subunidad NR1** en ninguna de las áreas estudiadas, aunque provocó una clara tendencia al aumento de la expresión de la subunidad NR1 en la región de vHip, siendo este incremento no significativo.

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Rammes y su grupo (2001), puesto que tras el tratamiento agudo con acamprosato (administración de dos dosis 200mg/Kg), estos autores detectaron un aumento de la expresión en Hip y PFC, aunque en esta última zona, únicamente afectó a una de las dos variantes estudiadas de la subunidad NR1 (1-3/1-4).

En relación con el efecto agudo de los antagonistas reconocidos NMDA sobre la expresión de las distintas subunidades que lo componen, los datos son escasos y no siempre coincidentes. Cabe destacar el estudio comparativo entre el efecto del acamprosato y de los antagonistas NMDA llevado a cabo por Rammes y cols (2001). Estos autores analizaron el efecto de memantine (10mg/Kg) y MK-801(1mg/Kg) administrados de forma aguda vía i.p. sobre la expresión de dos variantes de la NR1 del receptor en PFC y Hip. Sus resultados mostraron que dichos antagonistas se comportaban de manera casi idéntica al acamprosato, es decir, causaban una sobreexpresión de la subunidad NR1 en PFC, mientras que en Hip, únicamente se sobreexpresaba una de las variantes del receptor NR1.

Recientemente, sin embargo Anastasio and Johnson (2008), detectaron también mediante la técnica de western blot un aumento de la expresión de la subunidad NR1 en PFC tras la administración de Fenciclidina (PCP, 10mg/Kg, s.c.), un conocido antagonista NMDA, en ratas de 7 días de edad.

Una de las razones que podría explicar la ausencia de sobreexpresión de la subunidad NR1 observada en nuestros resultados, podría ser el hecho de que la señal cuantificada en la membrana se encontrara próxima a la saturación, tras la siembra de 30 μ g de proteína, ya que este valor posiblemente se encuentre en el límite de linealidad en nuestras condiciones experimentales (ver recta de calibración epígrafe 3.2.1.). Por tanto, cualquier aumento de la expresión de proteína no sería detectable con nuestro método analítico. También habría que tener en cuenta el hecho de que el grupo de Rammes (2001) analizó distintas isoformas de la subunidad NR1, y no todas se sobreexpresaban en las distintas regiones estudiadas. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que aunque el acamprosato sea capaz de modificar la expresión, tras administración aguda, de alguna de las ocho variantes de la subunidad NR1, la metodología empleada en nuestros experimentos, incluido el anticuerpo seleccionado, no permita observar globalmente dicha alteración.

Otros autores, como Wilson y cols (1998), utilizaron técnicas de hibridación in situ, para analizar la expresión del mRNA que codifica las subunidades del receptor NMDA, en PFC, toda la región del estriado y en el Hip, tras el tratamiento con MK-801 (2-y 4 horas) utilizando ratas neonatales (7 días). Este grupo investigador detectó, en las zonas estudiadas, una sobre expresión del mRNA que codifica la subunidad NR1, y concluyeron que la expresión de los genes que codifican las subunidades del receptor se puede modificar rápidamente en presencia del antagonista. No obstante, no hay que olvidar que un aumento del mRNA no necesariamente conlleva a un aumento de la expresión de la proteína.

Respecto a la **subunidad NR2A**, cabe resaltar que en NAc no se detectó señal cuantificable en nuestro diseño experimental. Aunque en la bibliografía consultada aparecen trabajos que sí detectan y cuantifican la

expresión de la subunidad NR2A en distintas regiones del estriado, es también cierto que todos ellos coinciden en señalar que los niveles de expresión son realmente bajos. En este sentido, Wilson y cols (1998) detectaron en estriado niveles más bajos de mRNA que los encontrados en otras zonas del estudio, como PFC e Hip. Landwehrmeyer y cols (1995), cuantificaron en estriado mediante hibridación in situ, el mRNA que codifica las distintas subunidades del receptor NMDA, y obtuvieron valores cinco veces inferiores del mRNA que codifica la subunidad NR2A, frente a los valores de mRNA correspondientes a las subunidades NR1 y NR2B. Siggins y cols (2003) cuantificaron en NAc mediante RT-PCR mRNA que codifica las distintas subunidades. La cuantificación detectó niveles tres veces más bajos para el mRNA que codifica la subunidad NR2A que los obtenidos para en los mRNA que codifican las subunidades NR2B y NR1. También en humanos, se han detectado niveles mas altos en estriado del mRNA que codifica la subunidad NR2B que el que codifica la subunidad NR2A (Küppenbender et al, 2000). Del mismo modo, Ary y cols (2007), aunque sí que fueron capaces de cuantificar la subunidad NR2A en NAc mediante inmunoblotting, también observaron que la cantidad de proteína fue mucho menor que la detectada para otras subunidades en NAc. Por lo tanto, la ausencia de señal observada en nuestro estudio sea debida, posiblemente, a que dicha subunidad no se exprese en cantidad detectable en nuestras condiciones experimentales en NAc.

La administración aguda de acamprosato provocó un fuerte aumento (205% respecto al control) en la expresión de la subunidad NR2A en PFC. Aunque algunos autores (Anastasio y Johnson, 2008) no encontraron modificación de la expresión de la subunidad NR2A en PFC tras el tratamiento agudo con PCP (10 mg/kg; s.c.), otros (Wilson et al, 1998) sí han detectado fuertes aumentos en la expresión del mRNA que codifica la

subunidad NR2A en PFC, tras el tratamiento agudo con MK-801 (4mg/Kg), lo que estaría en línea con nuestros datos en esta área.

En Hip, sin embargo, nuestros resultados son un poco sorprendentes y difieren claramente del efecto descrito por Wilson y cols (1998), que detectaron un fuerte aumento de la expresión del mRNA que codifica esta subunidad en Hip tras el tratamiento con MK-801.

Respecto a la **subunidad NR2B**, el tratamiento con acamprosato provocó un incremento en la expresión de la proteína en PFC (240%), frente a los valores detectados en el grupo control, mientras que en vHip se produjo una disminución, aunque no fue significativa. En este caso, nuestros datos son totalmente comparables a los obtenidos por Rammes y cols (2001). Estos autores detectaron en PCF una sobreexpresión de la subunidad tanto para el tratamiento con una inyección única, como para el tratamiento con dos inyecciones de acamprosato, mientras que en Hip no se detectaron cambios en la expresión de la subunidad. Además, también comprobaron que tanto memantine (10mg/Kg) como MK-801(1mg/Kg) causaban una sobreexpresión de la subunidad NR2B en PFC, mientras que en Hip no detectaron cambios en la expresión de esta subunidad.

Nuestros resultados también coinciden con los obtenidos por Anastasio y Johnson (2008) utilizando PCP como antagonista.

Por último y en relación con la expresión de la **subunidad NR2B** en NAc, nuestros resultados detectaron un aumento en la expresión de dicha subunidad (199% respecto al control) tras la administración de dos dosis de acamprosato i.p. No se han encontrado antecedentes bibliográficos que muestren el efecto de antagonistas NMDA administrados de manera aguda sobre los niveles de proteína correspondientes a las subunidades del receptor NMDA en NAc. Únicamente Wilson y cols (1998) realizaron medidas de mRNA mediante hibridación in situ en esta zona del cerebro,

con resultados compatibles con los nuestros y que mostraban un aumento del mRNA que codifica la subunidad NR2B.

Globalmente, se podría concluir que el acamprosato es capaz de modular la expresión de las subunidades NR2A y 2B de forma región-dependiente, cuando se administra de forma aguda. Otros antagonistas reconocidos del receptor NMDA también son capaces de producir esta modulación aunque parecen existir ciertas diferencias en sus efectos.

4.2.2. Tratamiento crónico con acamprosato

Puesto que la duración del tratamiento de deshabitación en alcohólicos crónicos con acamprosato es de al menos 1 año, se consideró oportuno analizar los cambios que la administración crónica del fármaco ocasiona en la expresión de las subunidades del receptor NMDA. No existen datos bibliográficos previos que muestren el efecto del acamprosato administrado de forma crónica sobre la expresión de las subunidades de los receptores NMDA, por lo que la finalidad de este grupo de experimentos fue simplemente analizar la expresión de las distintas subunidades que componen el receptor tras el tratamiento crónico con acamprosato, y comparar nuestros resultados con los obtenidos tras el tratamiento crónico con otros reconocidos antagonistas NMDA.

Se asumió como crónico un tratamiento de 21 días de duración en el cual se inyectó a los animales por vía i.p. una dosis de acamprosato 200mg/kg en intervalos de 12 horas (ver epígrafe 2.2.3.2.).

Nuestros resultados resumidos en el **cuadro 4.2**, muestran que el acamprosato administrado de forma crónica es capaz de incrementar de

modo significativo la expresión de la **subunidad NR1** en las tres áreas cerebrales estudiadas (PFC, NAc y vHip), siendo este aumento más pronunciado en la región del NAc (se detectó un incremento de más de 5 veces respecto al control). Hemos de señalar que para la realización de este grupo de experimentos, se utilizó una cantidad de 20µg de proteína que está lejos de la saturación, a diferencia de la cantidad utilizada en los experimentos de administración aguda. Este hecho creemos ha permitido detectar el incremento en la expresión de la subunidad NR1 y arroja dudas, más que razonables, sobre la validez de nuestros resultados referentes a la administración aguda de acamprosato.

	PFC	NAc	Hip
NR1	187% ^a	549% ^a	197% ^a
NR2A	80%	—	37.5% ^a
NR2B	37%	90%	128% ^a

Cuadro 4.2. Niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B tras el tratamiento crónico con acamprosato en las tres zonas cerebrales ensayadas (PFC, NAc, vHip). Los valores se expresan en porcentaje con respecto al control. (a) Indica diferencias significativas respecto al valor control (t-Student; p<0.05).

La expresión de la **subunidad NR2A** mostró una tendencia a disminuir en PFC, aunque no se detectaron diferencias significativas frente al grupo control. En vHip se detectó una disminución brusca de la expresión de dicha subunidad (37% de lo observado en el grupo control). En relación a la **subunidad NR2B**, el tratamiento con acamprosato provocó una disminución de la expresión de proteína en PFC y NAc (37% y 90% respectivamente respecto al control), aunque en ningún caso se detectó significación estadística. En vHip hubo un aumento estadísticamente significativo de la expresión de la proteína (128% respecto al control).

La revisión de los estudios realizados por distintos autores sobre la expresión de las subunidades que componen el receptor NMDA tras el

tratamiento crónico con distintos antagonistas, se muestra en el **cuadro 4.3**. Los resultados se han clasificado según el tratamiento, el animal de experimentación, técnica empleada, zona de estudio, y efecto del antagonista NMDA sobre las distintas subunidades del receptor estudiadas. También se han incluido, con fines comparativos, los efectos del etanol.

Antagonista	Tratamiento	Animal de exp.	Técnica	Zona de estudio	Efecto NR1	Efecto NR2A	Efecto NR2B	Cita
AP5	100µM 5 días	Ratón (Cultivos corticales)	Western -blot	PFC	160%	↑ 5 veces	↑ 5 veces	Follesa and Ticku, 1996a
	100µM 7 días	Rata (Cultivos corticales)	Ensayos de unión a ligandos	PFC	Aumento de la expresión general del receptor NMDA, no detecta distintas subunidades			Williams et al, 1992
MK-801	1µM 5 días	Ratón (Cultivos corticales)	Western -blot	PFC	172%	↑ 5 veces	↑ 5 veces	Follesa and Ticku, 1996a
memantine	10µM 5 días	Rata (Cultivos Hip)	Western -blot	Hip	No se modificó	79%	No se modificó	Maler et al, 2005
PCP (Fenciclidina)	Subcrónico (día 9 a 11 postnatal)	Rata	Western -blot	PFC	13 veces	↑ 10 veces	No se modificó	Anastasio and Johnson, 2008)
CPP ((+)-3-2-carboxi piperazin-4-yl, propyl-1-phosponic acid)	10µM 5 días	Ratón (Cultivos corticales)	Western -blot	PFC	164%	No detección	240%	Follesa and Ticku, 1996b
Etanol	75mM 5 días	Ratón (Cultivos corticales)	Western -blot	PFC	127%	No detección	163%	Follesa and Ticku, 1996b
	20% p/v 6días	Rata	Western -blot	PFC	135%	135%	137%	Kalluri et al, 1998
				Hip	136%	133%	135%	
	100mM 4días	Rata (Cultivos corticales)	Western -blot	PFC	111%	113%	109%	Chandler et al, 1999
	100mM 3días	Rata (Cultivos corticales)	Western -blot	PFC	168% (1splice variant)	No se modificó	138%	Nagy et al, 2003
				Hip	136% (2splice variant)	189%	151%	
50 mM 5 días	Rata (Cultivos Hip)	Western -blot	Hip	137%	128%	136%	Maler et al, 2005	

Cuadro 4.3. Resumen donde se muestran los estudios publicados relativos al efecto de diferentes antagonistas NMDA y del etanol administrados de manera crónica sobre la expresión de subunidades de este receptor. (a) Cuando aparecen porcentajes, se entienden en referencia al control considerado como 100%.

Respecto a la **subunidad NR1**, y como se observa en la tabla, la regulación positiva observada con acamprosato en PFC es realmente similar a la observada tras el tratamiento con distintos antagonistas

reconocidos. En el caso del Hip, sólo existe un estudio con memantine en el cual los autores no detectaron efecto alguno de este compuesto en la expresión de NR1 (Maler et al, 2005). Por otra parte, nuestros resultados en NAc son totalmente novedosos, a la par que sorprendentes, ya que se obtiene el máximo efecto (549% respecto al control).

Curiosamente, estos efectos del acamprosato y de los antagonistas sobre la expresión de subunidades del receptor NMDA son muy similares a los que produce la exposición crónica al etanol (Kalluri et al, 1998; Chandler et al, 1999; Nagy et al, 2003) (ver **cuadro 4.3.**).

En relación al efecto del tratamiento crónico con acamprosato sobre la expresión de la **subunidad NR2A** en PFC, nuestros experimentos no detectaron modificaciones en la expresión de carácter significativo, aunque sí una tendencia a la reducción de la expresión del receptor. Los antecedentes bibliográficos muestran un aumento en los niveles de dicha subunidad tras el tratamiento crónico con distintos antagonistas y posterior análisis por la metodología de western blot. Las diferencias en los resultados se podrían justificar en base a los distintos sustratos empleados así como a la duración del tratamiento. Así, el grupo investigador de Anastasio y Johnson (2008), aunque utilizaron la rata como animal de experimentación, se trataba de ejemplares neonatales, por lo que la diferencia en la edad de los animales podría explicar los diferentes resultados obtenidos. También habría que considerar el hecho de que el tratamiento crónico con acamprosato en nuestros experimentos se realizó durante 21 días, frente a los 3-7 días de tratamiento que utilizaron los demás autores (ver **cuadro 4.3.**).

Al igual que sucedía con el análisis de las muestras en el tratamiento agudo con acamprosato, en NAc tampoco se detectó señal cuantificable para la subunidad NR2A tras el tratamiento crónico con el fármaco.

Respecto a la expresión de la subunidad NR2A en la zona de vHip, nuestros resultados coinciden con los obtenidos en los escasos estudios encontrados en la bibliografía. Así el grupo investigador de Maler et al (2005), tras el tratamiento con memantine detectó únicamente variación en la expresión de subunidad NR2A, la cual disminuyó un 79% respecto al control (ver **cuadro 4.3**).

Al analizar el efecto del etanol crónico sobre la expresión de la subunidad NR2A, y de acuerdo con los datos revisados (**cuadro 4.3**), se observa una ligera tendencia a la regulación positiva en la mayoría de los casos. Incluso algunos autores como el grupo de Nagy y cols (2003), tras la exposición crónica a etanol de cultivos de Hip de rata, detectaron una disminución leve (10% respecto al valor del control), aunque significativa, de la expresión de la subunidad NR2A. Realmente, el efecto no es tan pronunciado ni tan evidente como en el caso de la subunidad NR1 comentado anteriormente.

La expresión de la **subunidad NR2B** en la zona de PFC tras el tratamiento con acamprosato muestra una tendencia a la disminución (37% respecto al control), aunque no se hallaron diferencias significativas respecto al grupo control. Esta falta de significación estadística, podría deberse al reducido número de muestras (n=3). A pesar de este hecho, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Anastasio y Johnson (2008) en sus experimentos (ver **cuadro 4.3**), puesto que no encontraron diferencias significativas en la expresión de la subunidad NR2B en PFC tras el tratamiento crónico con el PCP.

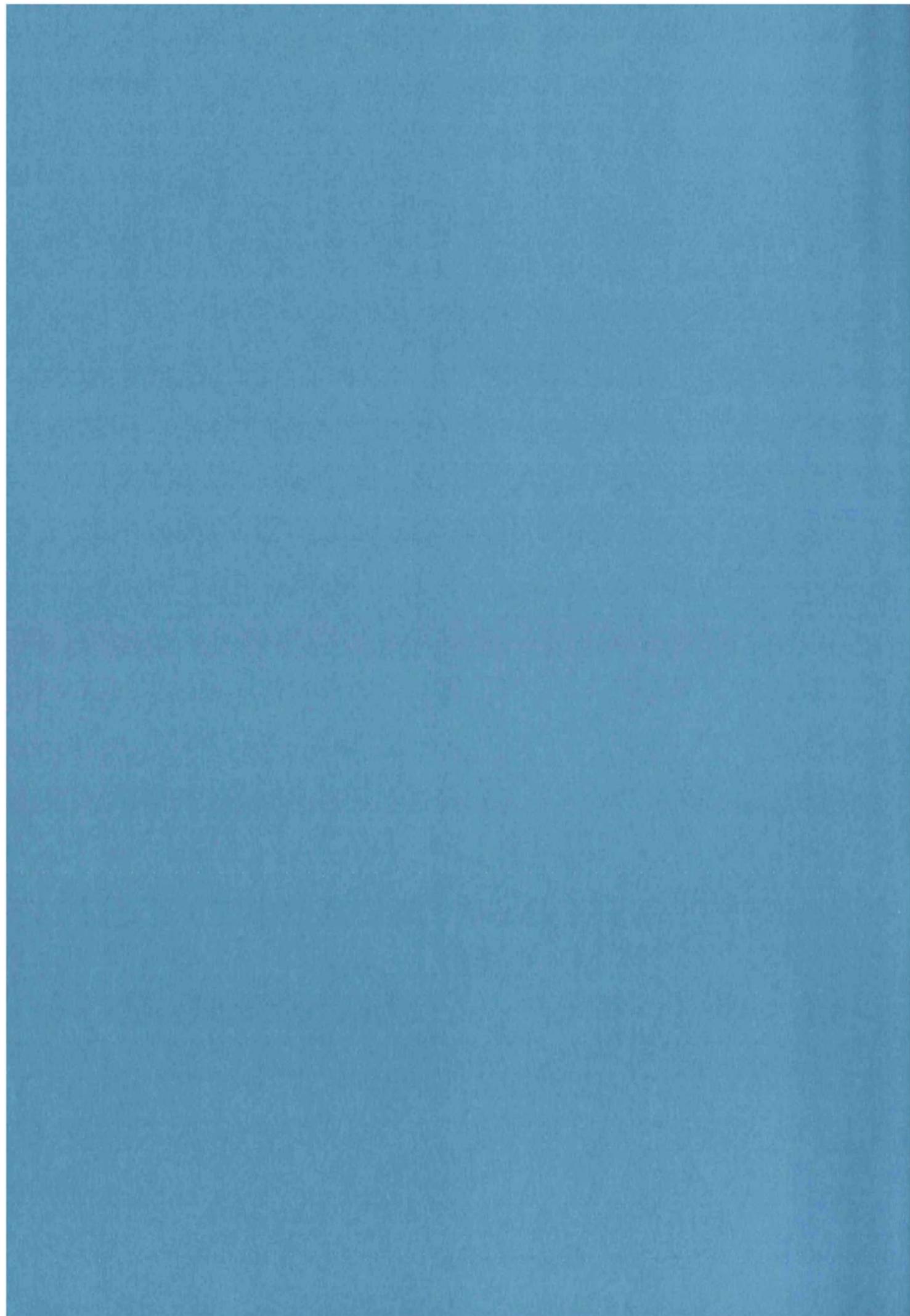
La expresión de la subunidad NR2B en NAc tras el tratamiento con acamprosato no se modificó, mientras que en vHip se detectó un aumento de 128% respecto al control. Los escasos estudios realizados sobre expresión de NR2B tras el tratamiento con antagonistas NMDA, en Hip no

detectaron variación en la expresión de esta subunidad (Maler et al, 2005), (ver **cuadro 4.3**).

En cambio, sí existen estudios sobre la expresión de subunidad NR2B en Hip donde se emplea el etanol administrado de forma crónica, y cuyos resultados son similares a los obtenidos en nuestros experimentos. El grupo de Nagy y cols (2003), tras la exposición crónica a etanol (ver **cuadro 4.3**) en cultivos de Hip de rata, detectaron un aumento (151% respecto al control) de la expresión de la subunidad NR2B. El grupo de Maler y cols (2005) también detectó un aumento de la expresión de la subunidad NR2B de 136% tras el tratamiento crónico con etanol (50 mM durante 5 días, ver **cuadro 4.3**)

Los resultados obtenidos tras la administración crónica de acamprosato, confirman la capacidad de fármaco para modular la expresión de subunidades que componen el receptor NMDA. Nuestros resultados, aunque no concluyentes, son novedosos y abren la posibilidad para la realización de una investigación más amplia y con nuevas metodologías, sobre el efecto que el tratamiento crónico con acamprosato tiene en la expresión de las distintas subunidades del receptor NMDA.

*Capítulo 5:
Resumen y
Conclusiones*



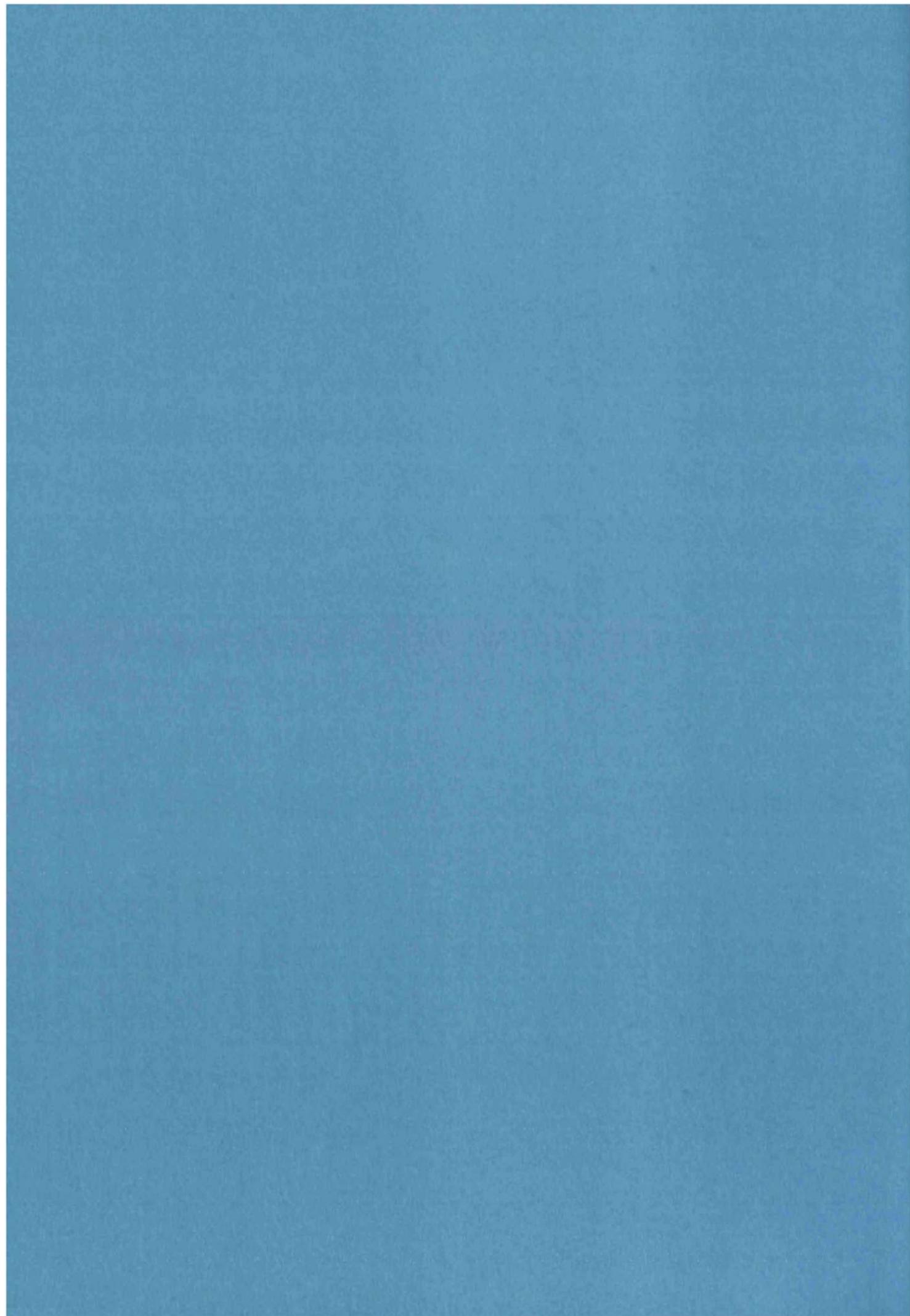
En la presente Memoria se ha abordado el estudio del mecanismo de acción del acamprosato, fármaco utilizado en la actualidad en varios países de la UE y en EEUU, por su acción preventiva de las recaídas en el consumo de alcohol en pacientes sometidos a tratamiento de deshabituación. El mecanismo a través del cual este fármaco ejerce sus efectos anticraving y preventivo de las recaídas está todavía por consensuar. A través del estudio de los efectos que el acamprosato ejerce sobre los niveles del neurotransmisor dopamina en el espacio extracelular del núcleo accumbens, neurotransmisor y área cerebral claramente involucrados en los trastornos adictivos y en el fenómeno de la recaída en el consumo de las drogas de abuso, hemos podido clarificar ciertos aspectos de la acción de este fármaco. También el análisis del efecto del acamprosato sobre la expresión de distintas subunidades constituyentes del receptor ionotrópico del tipo NMDA para el glutámico en diversas áreas cerebrales ha permitido avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de este fármaco anticraving.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios neuroquímicos indican que el acamprosato ejerce sus efectos sobre los niveles del neurotransmisor dopamina a través del bloqueo de los receptores ionotrópicos del tipo NMDA para el glutámico. Además su administración aguda y, lo que es más importante, su administración crónica (recordemos que la duración usual de los tratamientos en humanos es superior a 6 meses) en ratas provoca cambios significativos en la expresión de las subunidades que conforman el receptor NMDA, lo que podría contribuir al mecanismo de acción del mismo.

Las conclusiones más relevantes del trabajo que se presenta son las siguientes:

- 1- El acamprosato administrado de modo localizado en el núcleo accumbens es capaz de incrementar de modo dosis-dependiente los niveles extracelulares de DA
- 2- Los efectos del acamprosato sobre los niveles de dopamina en núcleo accumbens parecen ejercerse a través de su interacción con los receptores del tipo NMDA para el glutámico ya que:
 - es capaz de bloquear los efectos sobre los niveles de dopamina del propio NMDA, aplicado exógenamente de modo localizado, así como del glutámico endógeno
 - administrado localmente en núcleo accumbens bloquea los incrementos en los niveles de dopamina que genera la estimulación química del hipocampo ventral
- 3- El acamprosato muy probablemente actúa como antagonista, no como agonista parcial, de los receptores NMDA ya que el AP5, un reconocido antagonista, selectivo del receptor NMDA es incapaz de reducir los efectos del acamprosato
- 4- La administración de acamprosato por vía sistémica provoca cambios selectivos y región-dependientes, a nivel cerebral, de las subunidades del receptor NMDA ya que:
 - su administración aguda da lugar a cambios significativos en la expresión de las subunidades NR2A y NR2B, no de la subunidad NR1, en al menos dos de las tres regiones cerebrales estudiadas: corteza prefrontal, núcleo accumbens e hipocampo ventral de la rata
 - su administración crónica también provoca cambios significativos en la expresión de las subunidades del receptor NMDA que, en este caso, afectan a la subunidad NR1 en las tres regiones cerebrales estudiadas y a las subunidades NR2A y NR2B en el hipocampo ventral.

*Capítulo 6:
Bibliografía*



Albensi B.C. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr Pharm Des.*, 13(31), 3185-94, (2007).

Allgaier C., Franke H., Sobottka H., Scheibler P. Acamprosate inhibits Ca²⁺ influx mediated by NMDA receptors and voltage-sensitive Ca²⁺ channels in cultured rat mesencephalic neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 440-3, (2000).

Al Qatari M., Bouchenafa O., Littleton J. Mechanism of action of acamprosate. Part II. Ethanol dependence modifies effects of acamprosate on NMDA receptor binding in membranes from rat cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(4), 810-4, (1998).

Al Qatari M., Khan S., Harris B., Littleton J. Acamprosate is neuroprotective against glutamate-induced excitotoxicity when enhanced by ethanol withdrawal in neocortical cultures of fetal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(9), 1276-83, (2001).

Anastasio N.C., Johnson K.M. Differential regulation of the NMDA receptor by acute and sub-chronic phencyclidine administration in the developing rat. *J Neurochem*, 104(5), 1210-8, (2008).

Anderson K.G., Winger G., Woods J., Woolverton W.L. Reinforcing and discriminative-stimulus effects of ephedrine isomers in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.*, 65(1), 45-53, (2001).

Anton R.F. Neurobehavioural basis for the pharmacotherapy of alcoholism: current and future directions. *Alcohol Alcohol Suppl.*, 1, 43-53, (1996).

Anton R.F. What is craving? Models and implications for treatment. *Alcohol*

Research and Health, 23 (3), 165-173, (1999).

Ary A.W., Szumlinski K.K. Regional differences in the effects of withdrawal from repeated cocaine upon Homer and glutamate receptor expression: a two-species comparison. *Brain Res*, 1184, 295-305, (2007).

Badia-Elder N.E., Mosemiller A.K., Elder R.L., Froehlich J.C. Naloxone retards the expression of a genetic predisposition toward alcohol drinking. *Psychopharmacology (Berl)*, 144(3), 205-12, (1999).

Behan D.P., Grigoriadis D.E., Lovenberg T., Chalmers D., Heinrichs S., Liaw C., De Souza E.B. Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol Psychiatry*, 1(4), 265-77, (1996).

Berke J.D., Hyman S.E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 25(3), 515-32, (2000).

Berton F., Francesconi W.G., Madamba S.G., Zieglgansberger W., Siggins G.R. Acamprosate enhances N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission but inhibits presynaptic GABA(B) receptors in nucleus accumbens neurons. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(1), 183-91, (1998).

Bienkowski P., Kostowski W., Koros E. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone. *Eur J Pharmacol*, 374(3), 321-7, (1999).

Blaaha C.D., Yang C.R., Floresco S.B., Barr A.M., Phillips A.G. Stimulation of the ventral subiculum of the hippocampus evokes glutamate receptor-mediated changes in dopamine

efflux in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*, 9(5), 902-11, (1997).

Borlikova G.G., Le Merrer J., Stephens D.N. Previous experience of ethanol withdrawal increases withdrawal-induced c-fos expression in limbic areas, but not withdrawal-induced anxiety and prevents withdrawal-induced elevations in plasma corticosterone. *Psychopharmacology (Berl)*, 185(2), 188-200, (2006).

Breiter H.C., Gollub R.L., Weisskoff R.M., Kennedy D.N., Makris N., Berke J.D., Goodman J.M., Kantor H.L., Gastfriend D.R., Riorden J.P., Mathew R.T., Rosen B.R., Hyman S.E. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron*. 19(3), 591-611, (1997).

Brudzynski S.M., Gibson C.J. Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Res Bull*, 42(4), 303-8, (1997).

Buller A.L., Larson H.C., Morrisett R.A., Monaghan D.T. Glycine modulates ethanol inhibition of heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.*, 48(4), 717-23, (1995).

Burish T.G., Maisto S.A., Cooper A.M., Sobell M.B. Effects of voluntary short-term abstinence from alcohol on subsequent drinking patterns of college students. *J Stud Alcohol*, 42(11), 1013-20, (1981).

Cano-Cebrián M.J., Zornoza T., Polache A. and Granero L. Quantitative in vivo microdialysis in Pharmacokinetic studies: Some reminders. *Current Drug Metabolism*, 6, 83-90 (2005).

Capriles N., Rodaros D., Sorge R.E., Stewart J. A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 168(1-2), 66-74, (2003).

Carr D.B., Sesack S.R. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic Associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(10), 3864-3873, (2000).

Chabenat C., Chretien P., Daoust M., Moore N., Andre D., Lhuintre J.P., Saligaut C., Boucly P., Boismare F. Physicochemical, pharmacological and pharmacokinetic study of a new GABAergic compound, calcium acetylhomotaurinate. *Method Find. Exp. Clin*, 10, 311-317 (1988).

Chandler L.J., Norwood D., Sutton G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin Exp Res.*, 23(2), 363-70, (1999).

Charara A., Smith Y., Parent A. Glutamatergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labelling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 364(2), 254-66, (1996).

Chen Q., Veenman C.L., Reiner A. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience*, 73(3), 715-31, (1996).

Chen B.S., Roche K.W. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation.

Neuropharmacology, 53(3), 362-8, (2007).

Chick J., Howlett H., Morgan M.Y., Ritson B. United Kingdom Multicentre Acamprosate Study (UKMAS): a 6-month prospective study of acamprosate versus placebo in preventing relapse after withdrawal from alcohol. *Alcohol Alcohol.* 35(2), 176-87, (2000).

Childress A.R., Mozley P.D., McElgin W., Fitzgerald J., Reivich M., O'Brien C.P. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry.*, 156(1), 11-8, (1999).

Christie M.J., Bridge S., James L.B., Beart P.M. Excitotoxic lesions suggest an aspartatergic projection from rat medial prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain Res.*, 333(1), 169-72, (1985).

Christie M.J., Summers R.J., Stephenson J.A., Cook C.J., Beart P.M. Excitatory amino acid projections to the nucleus accumbens septi in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. *Neuroscience*, 22(2), 425-39, (1987).

Cornish J.L., Kalivas P.W. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci.*, 20(15), (2001).

Crews F.T., Morrow A.L., Criswell H., Breese G. Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol*, 39, 283-367, (1996).

Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.*, 11(3), 327-35, (2001).

Dahchour A., De Witte P., Bolo N., Nedelec J.F., Muzet M., Durbin P., Macher J.P. Central effects of

acamprosate: part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. *Psychiatry Res*, 82(2), 107-14, (1998).

Dahchour A., De Witte P. Effects of acamprosate on excitatory amino acids during multiple ethanol withdrawal periods. *Alcohol Clin Exp Res*, 27(3), 465-70, (2003).

Daoust M., Lhuintre J.P., Saligaut C., Moore N., Flipo J.L., Boismare F. Noradrenaline and GABA brain receptors are co-involved in the voluntary intake of ethanol by rats. *Alcohol Alcohol Suppl*, 1, 319-22, (1987).

Daoust M., Legrand E., Gewiss M., Heidbreder C., DeWitte P., Tran G., Durbin P. Acamprosate modulates synaptosomal GABA transmission in chronically alcoholised rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 41(4), 669-74, (1992).

Di Ciano P., Everitt B.J. Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*, 25(3), 341-60, (2001).

Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51(1), 7-61, (1999).

Drobes D.J., Anton R.F. Drinking in alcoholics following an alcohol challenge research protocol. *J Stud Alcohol*. 2000 Mar;61(2):220-4.

Dworkin S.I., Mirkis S., Smith J.E. Response-dependent versus response-independent presentation of cocaine: differences in the lethal effects of the drug. *Psychopharmacology (Berl)*, 117(3), 262-6, (1995).

Epstein D.H., Preston K.L., Stewart J., Shaham Y. Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berl)*, 189(1), 1-16, (2006).

Everitt B.J., Robbins T.W. Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*, 153(1), 17-30, (2000).

Fadda F., Rossetti Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 56(4), 385-431, (1998).

Faus M.T., Olcina J., Soler E., Martínez A. Fármacos anticonsumo: Actualización en el tratamiento del trastorno por dependencia del alcohol. *Rev. Esp. Drogodependencia*, 21, 271-290 (1996).

Finch D.M. Neurophysiology of converging synaptic inputs from the rat prefrontal cortex, amygdala, midline thalamus, and hippocampal formation onto single neurons of the caudate putamen and nucleus accumbens. *Hippocampus*, 6, 495-512, (1996).

Floresco S.B., Todd C.L., Grace A.A. Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci*, 21(13), 4915-4922, (2001).

Floresco S.B., West A.R., Ash B., Moore H., Grace A.A. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci*, 6(9), 968-973, (2003).

Follesa P., Ticku M.K. NMDA receptor upregulation: molecular studies in

cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure. *J Neurosci*. 16(7), 2172-8, (1996a).

Follesa P., Ticku M.K. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J Biol Chem*. 271(23), 13297-9, (1996b).

Forster G.L., Blaha C.D. Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci*, 12(10), 3596-604, (2000).

French S.J., Totterdell S. Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*, 446(2), 151-65, (2002).

French S.J., Totterdell S. Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 119(1), 19-31, (2003).

Fuller T.A., Russchen F.T., Price J.L. Sources of presumptive glutamergic/aspartergic afferents to the rat ventral striatopallidal region. *J Comp Neurol*. 258(3), 317-38, (1987).

Fuller R.K., Hiller-Sturmhöfel S. Alcoholism treatment in the United States. An overview. *Alcohol Res Health*, 23(2), 69-77, (1999).

Garavan H., Pankiewicz J., Bloom A., Cho J.K., Sperry L., Ross T.J., Salmeron B.J., Risinger R., Kelley D., Stein E.A. Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *Am J Psychiatry*, 157(11), 1789-98, (2000).

Gariano R.F., Groves P.M. Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. *Brain Res.* 462(1), 194-8, (1988).

Gass J.T., Olive M.F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol*, 75(1), 218-65, (2008).

George M.S., Anton R.F., Bloomer C., Teneback C., Drobos D.J., Lorberbaum J.P., Nahas Z., Vincent D.J. Activation of prefrontal cortex and anterior thalamus in alcoholic subjects on exposure to alcohol-specific cues. *Arch Gen Psychiatry*, 58(4), 345-52, (2001).

Gracy K.N., Pickel V.M. Ultrastructural immunocytochemical localization of the N-methyl-D-aspartate receptor and tyrosine hydroxylase in the shell of the rat nucleus accumbens. *Brain Res*, 739(1-2), 169-81, (1996).

Graybiel A.M., Aosaki T., Flaherty A.W., Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265(5180), 1826-31, (1994).

Groenewegen H.J., Vermeulen-Van der Zee E., te Kortschot A., Witter M.P. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1), 103-120, (1987).

Groenewegen H.J., Berendse H.W., Wolters J.G., Lohman A.H. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Prog Brain Res*, 85,95-116, (1990).

Groenewegen H.J., Berendse H.W., Meredith G.E., Haber S.N., Voorn P.,

Wolters J.G., Lohman A.S.M. Functional anatomy of the ventral, limbic system-innervated striatum. En: Wilner P., Scheel-Krüger J. (Eds.), *The Mesolimbic Dopamine System: from Motivation to Action*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 19-59, (1991).

Groenewegen H.J., Wright C.I., Beijer A.V. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res*, 107,485-511, (1996).

Grusser S.M., Wrase J., Klein S., Hermann D., Smolka M.N., Ruf M., Weber-Fahr W., Flor H., Mann K., Braus D.F., Heinz A. Cue-induced activation of the striatum and medial prefrontal cortex is associated with subsequent relapse in abstinent alcoholics. *Psychopharmacology (Berl)*, 175(3), 296-302, (2004).

Guerri C. Como actúa el alcohol en nuestro cerebro? *Trastornos adictivos*, 2(1), 14-25 (2000).

Harris B.R., Prendergast M.A., Gibson D.A., Rogers D.T., Blanchard J.A., Holley R.C., Fu M.C., Hart S.R., Pedigo N.W., Littleton J.M. Acamprosate inhibits the binding and neurotoxic effects of trans-ACPD, suggesting a novel site of action at metabotropic glutamate receptors. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(12), 1779-93, (2002).

Hemby S.E., Co C., Koves T.R., Smith J.E., Dworkin S.I. Differences in extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens during response-dependent and response-independent cocaine administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 133(1), 7-16, (1997).

Heyser C.J., Schulteis G., Koob G.F. Increased ethanol self-administration after a period of imposed ethanol

deprivation in rats trained in a limited access paradigm. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(5),784-91, (1997).

Heyser C.J., Schulteis G., Durbin P., Koob G.F. Chronic acamprosate eliminates the alcohol deprivation effect while having limited effects on baseline responding for ethanol in rats. *Neuropsychopharmacology*, 18(2), 125-33, (1998).

Hoffman P.L., Rabe C.S., Grant K.A., Valverius P., Hudspith M., Tabakoff B. Ethanol and the NMDA receptor. *Alcohol*, 7, 229-231, (1990).

Holter S.M., Landgraf R., Zieglgansberger W., Spanagel R. Time course of acamprosate action on operant ethanol self-administration after ethanol deprivation. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(5), 862-8, (1997).

Holter S.M., Spanagel R. Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 145(4), 360-9, (1999).

Hurley K.M., Herbert H., Moga M.M., Saper C.B. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol*. 308(2), 249-76, (1991).

Imperato A., Honore T., Jensen L.H. Dopamine release in the nucleus caudatus and in the nucleus accumbens is under glutamatergic control through non NMDA receptors: a study in freely-moving rats. *Brain Res*, 530(2), 223-8, (1990a).

Imperato A., Scrocco M.G., Bacchi S., Angelucci L. NMDA receptors and in vivo dopamine release in the nucleus accumbens and caudatus. *Eur J Pharmacol*, 187(3), 555-6, (1990b).

Jackson M.E., Frost A.S., Moghaddam B. Stimulation of prefrontal cortex at physiologically relevant frequencies inhibits dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem*, 78(4), 920-3, (2001).

Jackson M.E., Moghaddam B. Amygdala regulation of nucleus accumbens dopamine output is governed by the prefrontal cortex. *J Neurosci*, 21(2), 676-81, (2001).

Jaskiw G.E., Karoum F.K., Weinberger D.R. Persistent elevations in dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens after mild subchronic stress in rats with ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex. *Brain Res.*, 534(1-2), 321-3, (1990).

Johnson B.A., Ait-Daoud N. Medications to treat alcoholism. *Alcohol Res Health*, 23(2), 99-106, (2000).

Johnson B.A., Roache J.D., Javors M.A., DiClemente C.C., Cloninger C.R., Prihoda T.J., Bordnick P.S., Ait-Daoud N., Hensler J. Ondansetron for reduction of drinking among biologically predisposed alcoholic patients: A randomized controlled trial. *JAMA*, 284(8), 963-71, (2000).

Kalivas P.W., Pierce R.C., Cornish J., Sorg B.A. A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction. *J Psychopharmacol*, 12(1), 49-53, (1998).

Kalivas P.W., McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 168 (1-2), 44-56, (2003).

Kalluri H.S., Mehta A.K., Ticku M.K. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Brain Res Mol Brain Res*. 58(1-2), 221-4, (1998).

Kantak K.M., Black Y., Valencia E., Green-Jordan K., Eichenbaum H.B. Dissociable effects of lidocaine inactivation of the rostral and caudal basolateral amygdala on the maintenance and reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci.*, 22(3), 1126-36, (2002).

Karreman M. and Moghaddam B. The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum. An effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem*, 66, 589-598, (1996).

Karreman M., Westerink B.H.C., Moghaddam B. Excitatory amino acid receptors on the ventral tegmental area regulate dopamine release in the ventral striatum. *J Neurochem*, 67, 601-607, (1996).

Katner S.N., Weiss F. Ethanol-associated olfactory stimuli reinstate ethanol-seeking behavior after extinction and modify extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res*, 23(11), 1751-60, (1999).

Knapp D.J., Duncan G.E., Crews F.T., Breese G.R. Induction of Fos-like proteins and ultrasonic vocalizations during ethanol withdrawal: further evidence for withdrawal-induced anxiety. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(2), 481-93, (1998).

Kolachana B.S., Saunders R.C., Weinberger D.R. Augmentation of prefrontal cortical monoaminergic activity inhibits dopamine release in the caudate nucleus: an in vivo neurochemical assessment in the rhesus monkey. *Neuroscience*, 69(3), 859-68, (1995).

Kornet M., Goosen C., Van Ree J.M. Effect of naltrexone on alcohol consumption during chronic alcohol

drinking and after a period of imposed abstinence in free-choice drinking rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 104(3), 367-76, (1991).

Kretschmer B.D. Modulation of the mesolimbic dopamine system by glutamate: role of NMDA receptors. *J Neurochem*. 73(2), 839-48, (1999).

Krystal J.H., Petrakis I.L., Mason G., Trevisan L., D'Souza D.C. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther*, 99(1), 79-94, (2003).

Küppenbender K.D., Standaert D.G., Feuerstein T.J., Penney J.B., Jr, Young A.B., Landwehrmeyer G.B. Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol*, 17, 419(4), 407-21, (2000).

Kutsuwada T., Kashiwabuchi N., Mori H., Sakimura K., Kushiya E., Araki K., Meguro H., Masaki H., Kumanishi T., Arakawa M. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*. 358(6381), 36-41, (1992).

Landwehrmeyer G.B., Standaert D.G., Testa C.M., Penney J.B. Jr, Young A.B. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci*. 15(7 Pt 2), 5297-307, (1995).

Le A.D., Poulos C.X., Harding S., Watchus J., Juzysch W., Shaham Y. 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*, 21(3), 435-44, (1999).

Le A.D., Harding S., Juzytsch W., Watchus J., Shalev U., Shaham Y. The role of corticotrophin-releasing factor in stress-induced relapse to alcohol-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 150(3), 317-24, (2000).

Legault M., Wise R.A. Injections of N-methyl-D-aspartate into the ventral hippocampus increase extracellular dopamine in the ventral tegmental area and nucleus accumbens. *Synapse*, 31(4), 241-9, (1999).

Legault M., Rompre P.P., Wise R.A. Chemical stimulation of the ventral hippocampus elevates nucleus accumbens dopamine by activating dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J Neurosci*, 20(4), 1635-42, (2000).

Li T.K. Clinical perspectives for the study of craving and relapse in animal models. *Addiction*, 95 Suppl 2, S55-60, (2000).

Longabaugh R., Morgenstern J. Cognitive-behavioral coping-skills therapy for alcohol dependence. Current status and future directions. *Alcohol Res Health*, 23(2), 78-85, (1999).

Louilot A., Le Moal M., Simon H. Opposite influences of dopaminergic pathways to the prefrontal cortex or the septum on the dopaminergic transmission in the nucleus accumbens. An in vivo voltammetric study. *Neuroscience*, 29(1), 45-56, (1989).

Lovinger D.M., White G., Weight F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243, 1721-1724, (1989).

Lovinger D.M. Interactions between ethanol and agents that act on the NMDA-type glutamate receptor. *Alcohol*

Clin Exp Res. 20(8 Suppl), 187A-191A, (1996).

Lu X.Y., Churchill L., Kalivas P.W. Expression of D1 receptor mRNA in projections from the forebrain to the ventral tegmental area. *Synapse*, 25(2), 205-14, (1997).

Lu X.Y., Ghasemzadeh M.B., Kalivas P.W. Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 82(3), 767-80, (1998).

Maas L.C., Lukas S.E., Kaufman M.J., Weiss R.D., Daniels S.L., Rogers V.W., Kukes T.J., Renshaw P.F. Functional magnetic resonance imaging of human brain activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry*, 155(1), 124-6, (1998).

Maler J.M., Esselmann H., Wiltfang J., Kunz N., Lewczuk P., Reulbach U., Bleich S., R  ther E., Kornhuber J. Memantine inhibits ethanol-induced NMDA receptor up-regulation in rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 9, 1052(2), 156-62, (2005).

Mason B.J. Treatment of alcohol-dependent outpatients with acamprosate: a clinical review. *J Clin Psychiatry*. 62 Suppl 20, 42-8, (2001).

Markou A., Arroyo M., Everitt B.J. Effects of contingent and non-contingent cocaine on drug-seeking behaviour measured using a second-order schedule of cocaine reinforcement in rats. *Neuropsychopharmacology*, 20(6), 542-55, (1999).

Marlatt G.A. Taxonomy of high-risk situations for alcohol relapse: evolution and development of a cognitive-behavioral model. *Addiction*, 91, (1996).

Martin G., Guadaño-Ferraz A., Morte B., Ahmed S., Koob G.F., De Lecea L., Siggins G.R. Chronic morphine treatment alters N-methyl-D-aspartate receptors in freshly isolated neurons from nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, 311(1), 265-73, (2004).

Mayer S., Harris B., Gibson D.A., Blanchard J., Prendergast M.A., Holley R.C., Littleton J. Acamprosate has no effect on NMDA-induced toxicity but reduces toxicity induced by spermidine or by changing the medium in organotypic hippocampal slice cultures from rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(5), 655-62, (2002).

McFarland K., Kalivas P.W. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*. 21(21), 8655-63, (2001).

McFarland K., Lapish C.C., Kalivas P.W. Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*., 23(8), 3531-7, (2003).

McFarland K., Davidge S.B., Lapish C.C., Kalivas P.W. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci*., 24(7), 1551-60, (2004).

McKinzie D.L., Sajdyk T.J., McBride W.J., Murphy J.M., Lumeng L., Li T.K., Shekhar A. Acoustic startle and fear-potentiated startle in alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) lines of rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 65(4), 691-6, (2000).

McLaughlin J., See R.E. Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats.

Psychopharmacology (Berl), 168(1-2), 57-65, (2003).

McLellan A.T., Lewis D.C., O'Brien C.P., Kleber H.D. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA*, 284(13), 1689-95, (2000).

Meil W.M., See R.E. Lesions of the basolateral amygdala abolish the ability of drug associated cues to reinstate responding during withdrawal from self-administered cocaine. *Behav Brain Res*., 87(2), 139-48, (1997).

Melendez R.I., Hicks M.P., Cagle S.S., Kalivas P.W. Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res*., 29(3), 326-33, (2005).

Meredith G.E. The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 140-56, (1999).

Modell J.G., Glaser F.B., Mountz J.M., Schmalz S., Cyr L. Obsessive and compulsive characteristics of alcohol abuse and dependence: quantification by a newly developed questionnaire. *Alcohol Clin Exp Res*., 16(2), 266-71, (1992a).

Modell J.G., Glaser F.B., Cyr L., Mountz J.M. Obsessive and compulsive characteristics of craving for alcohol in alcohol abuse and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*., 16(2), 272-4, (1992b).

Moghaddam B., Gruen R.J., Roth R.H., Bunney B.S., Addams R.N. Effect of L-Glutamate on the release of striatal dopamine: in vivo dialysis and electrochemical studies. *Brain Res*, 518, 55-60, (1990).

Moghaddam B. and Gruen R.J. Do endogenous excitatory amino acids influence striatal dopamine release? *Brain Res*, 544, 329-330, (1991).

Monyer H., Burnashev N., Laurie .DJ., Sakmann B., Seeburg P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529-40, (1994).

Mora F., Segovia G., Del Arco A. Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res Rev.* (In press), (2007).

Mulder A.B., Hodenprijl M.G., Lopes da Silva F.H. Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci.*, 18(13), 5095-102, (1998).

Murase S., Grenhoff J., Chouvet G., Gonon F.G., Svensson T.H. Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. *Neurosci Lett.* 157(1), 53-6, (1993).

Myrick H., Anton R.F., Li X., Henderson S., Drobos D., Voronin K., George M.S. Differential brain activity in alcoholics and social drinkers to alcohol cues: relationship to craving. *Neuropsychopharmacology*, 29(2), 393-402, (2004).

Naassila M., Hammoumi S., Legrand E., Durbin P., Daoust M. Mechanism of action of acamprosate. Part I. Characterization of spermidine-sensitive acamprosate binding site in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(4), 802-9, (1998).

Nagy J., Horváth C., Farkas S., Kolok S., Szombathelyi Z. NR2B subunit selective NMDA antagonists inhibit

neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones. *Neurochem Int.* 44(1), 17-23, (2003).

Naranjo C.A., George S.R., Bremner K.E. Novel neuropharmacological treatments of alcohol dependence. *Clin Neuropharmacol*, 15 Suppl 1 Pt A,74A-75A, (1992).

Naranjo C.A., Poulos C.X., Bremner K.E., Lanctot K.L. Fluoxetine attenuates alcohol intake and desire to drink. *Int Clin Psychopharmacol*, 9(3), 163-72, (1994).

Neznanova O.N., Zvartau E.E., Beshpalov A.Y. Behavioral analysis of the saccharin deprivation effect in rats. *Behav Neurosci*, 116(5), 747-56, (2002).

Nicoletti F., Bruno V., Catania M.V., Battaglia G., Copani A., Barbagallo G., Ceña V., Sanchez-Prieto J., Spano P.F., Pizzi M. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology*, 38(10), 1477-84, (1999).

Nie Z., Madamba S.G., Siggins G.R. Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 271(3), 1566-73, (1994).

O'Malley S.S., Jaffe A.J., Chang G., Schottenfeld R.S., Meyer R.E., Rounsaville B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry*, 49(11), 881-7, (1992).

Omelchenko N., Sesack S.R. Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol.* 483(2), 217-35, (2005).

- Omelchenko N., Sesack S.R.** Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. *Neuroscience* 146(3), 1259-74, (2007).
- Park W.K., Bari A.A., Jey A.R., Anderson S.M., Spealman R.D., Rowlett J.K., Pierce R.C.** Cocaine administered into the medial prefrontal cortex reinstates cocaine-seeking behavior by increasing AMPA receptor-mediated glutamate transmission in the nucleus accumbens. *J Neurosci.*, 22(7), 2916-25, (2002).
- Paxinos G. and Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Sydney, (1986).
- Putzke J., Spanagel R., Tolle T.R., Zieglgansberger W.** The anti-craving drug acamprosate reduces c-fos expression in rats undergoing ethanol withdrawal. *Eur J Pharmacol*, Dec 12, 317(1), 39-48, (1996).
- Rammes G., Mahal B., Putzke J., Parsons C., Spielmanns P., Pestel E., Spanagel R., Zieglgansberger W., Schadrack J.** The anti-craving compound acamprosate acts as a weak NMDA-receptor antagonist, but modulates NMDA-receptor subunit expression similar to memantine and MK-801. *Neuropharmacology*, 40(6), 749-60, (2001).
- Randoll L.A., Wilson W.R., Weaver M.S., Spuhler-Phillips K., Leslie S.W.** N-methyl-D-aspartate-stimulated increases in intracellular calcium exhibit brain regional differences in sensitivity to inhibition by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.*, 20(2), 197-200, (1996).
- Reilly M.T., Lobo I.A., McCracken L.M., Borghese C.M., Gong D., Horishita T., Harris R.A.** Effects of acamprosate on neuronal receptors and ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Alcohol Clin Exp Res.*, 32(2), 188-96, (2008).
- Ren H., Salous A.K., Paul J.M., Lamb K.A., Dwyer D.S., Peoples R.W.** Functional interactions of alcohol-sensitive sites in the NMDA receptor M3 and M4 domains. *J Biol Chem.* (In press), (2008).
- Riedel G., Platt B., Micheau J.** Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res.* 18, 140(1-2), 1-47, (2003).
- Ripley T.L., Little H.J.** Effects on ethanol withdrawal hyperexcitability of chronic treatment with a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 272(1), 112-8, (1995).
- Rodd-Henricks Z.A., McKinzie D.L., Shaikh S.R., Murphy J.M., McBride W.J., Lumeng L., Li T.K.** Alcohol deprivation effect is prolonged in the alcohol preferring (P) rat after repeated deprivations. *Alcohol Clin Exp Res.* 24(1), 8-16, (2000).
- Ronald K.M., Mirshani T., Woodward J.J.** Ethanol inhibition of N-methyl D-aspartate receptors is reduced by site-directed mutagenesis of a transmembrane domain phenylalanine residue. *J Biolog Chem*, 276, 44729-44735, (2001).
- Salimov R., Salimova N., Klodt P., Maisky A.** Interaction between alcohol deprivation and morphine withdrawal in mice. *Drug Alcohol Depend*, 34(1), 59-66, (1993).
- Santiago M. and Westerink B.H.C.** Characterization of the in vivo release of dopamine as recorder by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 342, 407-414 (1990).

Sarnyai Z., Shaham Y., Heinrichs S.C. The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacol Rev*, 53(2), 209-43, (2001).

Sass H., Soyka M., Mann K., Zieglgansberger W. Relapse prevention by acamprosate. Results from a placebo-controlled study on alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry*, 53(8), 673-80, (1996).

Schneider F., Habel U., Wagner M., Franke P., Salloum J.B., Shah N.J., Toni I., Sulzbach C., Honig K., Maier W., Gaebel W., Zilles K. Subcortical correlates of craving in recently abstinent alcoholic patients. *Am J Psychiatry*, 158(7), 1075-83, (2001).

See R.E., Kruzich P.J., Grimm J.W. Dopamine, but not glutamate, receptor blockade in the basolateral amygdala attenuates conditioned reward in a rat model of relapse to cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 154(3), 301-10, (2001).

Segovia G., Del Arco A., Mora F. Endogenous glutamate increases extracellular concentrations of dopamine, GABA and taurine through NMDA and AMPA/kainite receptors in striatum of the freely moving rat: a microdialysis study. *J Neurochem*, 69(4), 1476-1483, (1997).

Self D.W., Nestler E.J. Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Depend*, 51(1-2), 49-60, (1998).

Self D.W., Genova L.M., Hope B.T., Barnhart W.J., Spencer J.J., Nestler E.J. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci*, 18(5), 1848-59, (1998).

Sesack S.R., Deutch A.Y., Roth R.H., Bunney B.S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterogradetracer-tracing study with phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol*, 290, 213-242, (1989).

Sesack S.R., Pickel V.M. In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res*, 527(2), 266-79, (1990).

Sesack S.R., Pickel V.M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol*, 320(2), 145-160, (1992).

Sesack S.R., Carr D.B., Omelchenko N., Pinto A. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Ann N Y Acad Sci*, 1003, 36-52, (2003).

Shaham Y., Rajabi H., Stewart J. Relapse to heroin-seeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal. *J Neurosci*, 16(5), 1957-63, (1996).

Shaham Y., Funk D., Erb S., Brown T.J., Walker C.D., Stewart J. Corticotropin-releasing factor, but not corticosterone, is involved in stress-induced relapse to heroin-seeking in rats. *J Neurosci*, 17(7), 2605-14, (1997).

Shaham Y., Erb S., Stewart J. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain Res Brain Res Rev*, 33(1), 13-33, (2000).

Siggins G.R., Martin G., Roberto M., Nie Z., Madamba S., De Lecea L. Glutamatergic transmission in opiate and alcohol dependence. *Ann N Y Acad Sci.*, 1003, 196-211, (2003).

Sinclair J.D., Senter R.J. Development of an alcohol-deprivation effect in rats. *Q J Stud Alcohol*, 29(4), 863-7, (1968).

Sinclair J.D., Li T.K. Long and short alcohol deprivation: effects on AA and P alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 6(6), 505-9, (1989).

Sinha R., Lacadie C., Skudlarski P., Fulbright R.K., Rounsaville B.J., Kosten T.R., Wexler B.E. Neural activity associated with stress-induced cocaine craving: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology(Berl)*. 183(2), 171-80, (2005).

Smothers C.T., Woodward J.J. Effect of the NR3 subunit on ethanol inhibition of recombinant NMDA receptors. *Brain Res.*, 987(1), 117-21, (2003).

Spanagel R. and Zieglgänsberger W. Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci*, 18, 54-59, (1997).

Spanagel R., Hölter S.M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J Neural Transm*, 107(6), 669-80, (2000).

Stewart J. Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J. Psychiatry Neurosci*, 25(2), 125-36, (2000).

Svensson T.H., Tung C.S. Local cooling of pre-frontal cortex induces pacemaker-like firing of dopamine neurons in rat ventral tegmental area in

vivo. *Acta Physiol Scand.*, 136(1), 135-6, (1989).

Taber M.T. and Fibiger H.C. Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci*, 15, 3896-3904, (1995).

Taber M.T., Baker G.B., Fibiger H.C. Glutamate receptor agonists decrease extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens in vivo. *Synapse*, 24(2):165-72, (1996).

Tache Y., Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest*, 117(1):33-40, (2007).

Taepavarapruk P., Floresco S.B., Phillips A.G. Hyperlocomotion and increased dopamine efflux in the rat nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum: role of ionotropic glutamate and dopamine D1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 151(2-3), 2-51, (2000).

Taepavarapruk P., Phillips A.G. Neurochemical correlates of relapse to d-amphetamine self-administration by rats induced by stimulation of the ventral subiculum. *Psychopharmacology (Berl)*, 168(1-2), 99-108, (2003).

Takahata R., Moghaddam B. Target-specific glutamatergic regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurochem*, 75(4), 1775-8, (2000).

Tong Z.Y., Overton P.G., Clark D. Stimulation of the prefrontal cortex in the rat induces patterns of activity in midbrain dopaminergic neurons which resemble natural burst events. *Synapse*, 22(3), 195-208, (1996).

Totterdell S., Smith A.D. Convergence of hippocampal and dopaminergic input onto identified neurons in the nucleus accumbens of the rat. *J Chem Neuroanat.*, 2(5), 285-98, (1989).

Tzschentke T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63, 214-320, (2001).

Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 213(4514), 1394-7, (1981).

Vicini S., Wang J.F., Li J.H., Zhu W.J., Wang Y.H., Luo J.H., Wolfe B.B., Grayson D.R. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol.* 79(2), 555-66, (1998).

Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol.* 13(4), 337-45, (1999).

Volkow N.D., Wang G.J., Telang F., Fowler J.S., Logan J., Childress A.R., Jayne M., Ma Y., Wong C. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci.*, 26(24), 6583-8, (2006).

Volpicelli J.R., Alterman A.I., Hayashida M., O'Brien C.P. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry*, 49(11), 876-80, (1992).

Voorn P., Vanderschuren L.J., Groenewegen H.J., Robbins T.W., Pennartz C.M. Putting a spin on the

dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.*, 27(8), 468-74, (2004).

Vorel S.R., Liu X., Hayes R.J., Spector J.A., Gardner E.L. Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science*, 292(5519), 1175-8, (2001).

Walaas I. Biochemical evidence for overlapping neocortical and allocortical glutamate projections to the nucleus accumbens and rostral caudatoputamen in the rat brain. *Neuroscience*, 6(3), 399-405, (1981).

Wang G.J., Volkow N.D., Fowler J.S., Cervany P., Hitzemann R.J., Pappas N.R., Wong C.T., Felder C. Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sci.*, 64(9), 775-84, (1999).

Wang H., Pickel V.M. Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol*, 442(4), 392-404, (2002).

Wang J., Carnicella S., Phamluong K., Jeanblanc J., Ronesi J.A., Chaudhri N., Janak P.H., Lovinger D.M., Ron D. Ethanol induces long-term facilitation of NR2B-NMDA receptor activity in the dorsal striatum: implications for alcohol drinking behavior. *J Neurosci.* 28, 27(13), 3593-602, (2007).

West A.R., Floresco S.B., Charara A., Rosenkranz J.A., Grace A.A. Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann N.Y. Acad Sci*, 1003, 53-74, (2003).

Westerink B.H.C., Kwint H.F., DeBries J.B. The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual probe Microdialysis study in the ventral

tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 16(8), 2605-2611, (1996).

Wexler B.E., Gottschalk C.H., Fulbright R.K., Prohovnik I., Lacadie C.M., Rounsaville B.J., Gore J.C. Functional magnetic resonance imaging of cocaine craving. *Am J Psychiatry*, 158(1), 86-95, (2001).

White N.M., McDonald R.J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem.*, 77(2), 125-84, (2002).

Whitelaw R.B., Markou A., Robbins T.W., Everitt B.J. Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl.)*, 127(3), 213-24, (1996).

Whitworth A.B., Fischer F., Lesch O.M., Nimmerrichter A., Oberbauer H., Platz T, Potgieter A., Walter H., Fleischhacker W.W. Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence. *Lancet*, 25;347(9013), 1438-42, (1996).

Williams K., Dichter M.A., Molinoff P.B. Up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors on cultured cortical neurons after exposure to antagonists. *Mol Pharmacol.*, 42(1), 147-51, (1992).

Wilson M.A., Kinsman S.L., Johnston M.V. Expression of NMDA receptor subunit mRNA after MK-801 treatment in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res.*, 109(2), 211-20, (1998).

Yamakura T., Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol.* 59(3):279-98, (1999).

You Z.B., Tzschentke T.M., Brodin E., Wise R.A. Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases cholecystokinin, glutamate, and dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *J Neurosci.*, 18(16), 6492-500, (1998).

Youngren K.D., Daly D.A., Moghaddam B. Distinct actions of endogenous excitatory amino acids on the outflow of dopamine in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, 264(1), 289-93, (1993).

Zeise M.L., Kasparov S., Capogna M., Zieglansberger W. Acamprosate (calciumacetylhomotaurinate) decreases postsynaptic potentials in the rat neocortex: possible involvement of excitatory amino acid receptors. *Eur J Pharmacol*, 231(1), 47-52, (1993).

Zernig G., Fabisch K., Fabisch H. Pharmacotherapy of alcohol dependence. *Trends Pharmacol Sci*, 18(7), 229-31, (1997).

