



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Facultad de Psicología

Departamento de Psicobiología

Programa de Neurociencia

**Análogos de las benzotropinas como agentes
terapéuticos para la adicción a la cocaína: estudios
preclínicos en modelos animales de conducta adictiva**

Antonio Ferragud Faus

Dirigida por el Dr. Juan José Canales Conejero

Valencia 2015

El Dr. Juan José Canales Conejero, profesor (Reader) del Departamento de Neurociencia, Psicología y Conducta de la Universidad de Leicester (Reino Unido),

INFORMA,

Que el trabajo titulado “ANÁLOGOS DE LAS BENZTROPINAS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS PARA LA ADICCIÓN A LA COCAÍNA: ESTUDIOS PRECLÍNICOS EN MODELOS ANIMALES DE CONDUCTA ADICTIVA” ha sido realizado por D. Antonio Ferragud Faus, bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste, y a efectos oportunos, firmo el presente informe.

UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Juan José Canales Conejero

Yo, Antonio Ferragud Faus, declaro que soy autor del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el laboratorio de Biopsicología y Neurociencia Comparada, bajo la dirección del Dr. Juan José Canales Conejero.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento.

Antonio Ferragud Faus

La presente Tesis ha sido financiada con una beca predoctoral FPU y con fondos de la Red de Trastornos Adictivos (RDO6/0001/0032 RETICS, Instituto de Salud Carlos III), Plan Nacional de Biomedicina (Ministerio de Ciencia e Innovación), Plan Nacional sobre Drogas (PNSD2008-057, Ministerio de Sanidad y Consumo), Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad) y FEPAD (Fundación para el Estudio y Prevención de las Adicciones y Drogodependencias).

*“La verdadera ciencia enseña,
sobre todo, a dudar y a ser ignorante”*

Miguel de Unamuno

Agradecimientos

Después de todos estos años con la entrega de la tesis se cierra una etapa que ha sido muy importante en mi vida. Hace ya muchos años (no quiero ni pensar cuántos) que entré por primera vez al Cavanilles y me reuní por primera vez con Juanjo en su despacho. Su visión de la neurociencia en seguida me cautivó, e instantáneamente supe que eso es lo que durante mucho tiempo había estado buscando y no sabía siquiera que era posible. Ser investigador del cerebro. No podía ni imaginar nada que fuera más increíble y excitante que eso. Ha llovido mucho desde aquel entonces, pero aquella llama que prendió en aquellos momentos sigue todavía encendida. Todavía sigo sintiendo como un sueño el entender un poquito qué somos, por qué somos como somos ¿puede haber algo más fascinante? Es un sueño imposible, ya que siempre unas preguntas llevan a otras, pero todas formas, sigo sintiendo que vale la pena intentar avanzar lo máximo posible en ese camino a lo desconocido. No podría si no, empezar agradeciendo de manera especial a mi director de tesis Juanjo Canales haberme abierto la puerta a este mundo fascinante y haber confiado en mí. Ha sido mi padre científico y siempre le estaré agradecido por haber descubierto estas maravillosas realidades del cerebro. Aunque el camino no siempre fue fácil, sin duda valió la pena.

A lo largo de estos muchos años son muchas las personas a las que tengo que agradecer, sin las cuales esta tesis difícilmente hubiera visto la luz. De los Biopsicólogos: Gracias a Vite, compañero de aventuras, tantos grandes momentos compartidos, dentro y fuera de aquellas paredes. Gràcies a Laura, que desde el primer moment junt a Irene va acceptar adoptar-me i va ser com una espècie de mamà de aquell xiquet sapalastrós de psicologia que no havia sentit mai parlar de rutes de senyalizació, proteïnes, cascades..., ni PB.. Gracias también a Ana Pérez, quien fue “mi primera *post-doc*”, y de la que siempre guardaré imborrables momentos. Gracias Sandra (y al amigo *kindling* que te trajo por nuestros dominios *ewoks*).

Gracias también de forma muy especial a José Manuel Verdugo y al laboratorio de Neurociencia Comparada. Nos acogiste con generosidad, siempre nos apoyaste y siempre te estaré agradecido. Las charlas contigo siempre han sido fascinantes y siempre las recordaré con cariño. No te creas, que no he echado de menos esas agudas historias de ciencia, de política, del mundo que siempre estabas dispuesto a compartir.

El Cavanilles y su gente fue una segunda familia para mi, y ese semisótano, mi segunda casa. Gracias Irene. Representas una de las partes más importantes del recuerdo feliz de todos esos años y sin duda, no estaría aquí sin tu ayuda. Muchísimas gracias, de verdad, a toda la familia: a Vivian, a Clara “la rubia”, a Patri, a Susana, a Mario; A las nuevas generaciones: María y Arancha; y a los más experimentados: Salomé y Ulises. Gracias a los mis “estudiantes preferidos”, de los que tanto aprendí y pasé momentos geniales: Ozden Baltekin, Raphael Stenfield, Katherina y a Ana “mismamente”. Gracias al Instituto Cavanilles, donde tan a gusto me he sentido. A Darwin y a su influencia, y casi en el mismo orden de cosas a Toni y a Julián, de Materiales. Cuantísimas veces nos habéis echado una mano inventando y haciendo posible nuevos y ingeniosos “juguetes” para los animales de manera totalmente desinteresada.

También quería dar las gracias al departamento de Psicobiología. En especial a Alicia Salvador, mi tutora de tesis, quien siempre tuvo la puerta abierta para mi y me mostró su apoyo. También quiero agradecer de forma especial a Marien Gadea por su sanísima locura, su visión, su sentido del humor y su pasión docente y a Raul Espert que como a tantos muchos alumnos de sus cursos, supo cautivar e inspirar con sus experiencias clínicas e indagaciones neuropsicológicas. Experiencias sin las cuales difícilmente habría acabado en estos derroteros científicos. Del ámbito de la Facultad, pero fuera de la Psicobiología, no puedo dejar de agradecer el apoyo y amistad de Fernando García a quien siempre guardaré un especial cariño.

Gracias a Ramón (con el quien empecé toda esta aventura, y que siempre fue a la vez más joven y más viejo que yo) y a Nico. Siempre seréis mis pseudocientíficos preferidos. Gracias a Vicente Pedrón y a Mateo. Mis psicólogos preferidos, sin los cuales la vida hubiera sido mucho más gris y aburrida. Grandísimos talentos y grandísimas personas.

Gracias a Jorge Bertolin y a Rafa. Vuestra amistad y apoyo desde fuera del “ring” es más importante de lo que podáis imaginar.

Thanks to all the people from University of Canterbury in New Zealand for that wonderful year and a half. Neville for making possible for us to work in the department of Psychology. To John D-A, for being such an inspiring and nice person, Thanks to Neroli, Silvana and Emma for being such a nice staff! Also thanks to to Rachel, James and Kyle. Our kiwi lab mates. *Sweet...!*

Thanks to important people that I met there and are still an important part of my live. Thanks Jenelle and thanks to Gary and Aliette (our loved, awesome, *spagermlish* family). Without your support and love during this time this wouldn't have been possible!

Y aquí me quedo sin palabras., Clara, nunca podré agradecer todo lo que has hecho por mi. Me es imposible expresar con palabras lo que has significado en todo este tiempo. Por supuesto que sin ti la tesis no hubiera sido posible. Ni la tesis ni muchas otras cosas. Has sido mi mejor amigo, mi mejor compañera y mi otra mitad.. Gracias por tu paciencia infinita y tu fuerza. Gracias por ser la mejor compañera de viaje.

Quiero acabar agradeciendo la realización de esta tesis a los padres. Esos grandes sufridores, casi siempre en silencio, casi siempre incomprensidos. A quienes tanto extraño. Quienes me han enseñado todo lo que soy, bueno, todo no. Sólo lo bueno.

Boston, Octubre 2015.

Toni.

A mis padres

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1.
1.- ADICCIÓN A LOS PSICOESTIMULANTES	1.
1.1. Introducción	1.
1.2. Teorías de la adicción	2.
1.3. Adicción: un trastorno del desarrollo	3.
1.4. El ciclo adictivo	4.
1.5. El circuito de la adicción	5.
1.5.1 Sistema de la recompensa	7.
1.5.2. Funciones ejecutivas y sistema de hábitos	8.
1.5.3. Sistemas de aprendizaje y memoria	10.
1.6. Efectos agudos de los psicoestimulantes	11.
1.6.1. Efectos subjetivos y farmacocinéticos	11.
1.6.2. Mecanismos de acción	12.
1.6.3. Neurofarmacología relacionada con el abuso de psicoestimulantes	13.
1.7. Efectos crónicos de los psicoestimulantes	16.
1.8 Implicación de otros sistemas neurotransmisores en los efectos inducidos por los psicoestimulantes	18.
1.8.1. Sistema serotoninérgico	18.
1.8.2. Sistema noradrenérgico	20.
1.8.3. Sistema glutamatérgico	21.
1.8.4. Sistema GABAérgico	22.
2.- MODELOS ANIMALES	23.
2.1. Introducción	23.
2.2. Modelos animales de recaída	24.
2.2.1. Preferencia de lugar condicionada	25.
2.2.2. Autoadministración	26.
2.3. Factores que desencadenan la recaída	28.
2.3.1. Recaída inducida por drogas	28.
2.3.2. Recaída inducida por estrés	28.
2.3.3. Recaída inducida por claves	29.
2.4. Validez del modelo de <i>reinstatement</i> de recaída	31.

3.- TERAPÉUTICA 34.

- 3.1. Medicaciones testadas para el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes en humanos 34.
- 3.2. Medicaciones anti-recaída testadas en modelos animales 38.

4.- ANÁLOGOS DE LA BENZTROPINA 40.

- 4.1. Introducción 40.
- 4.2. Análogos de la Benzotropina 41.
 - 4.2.1. Análogos de la BZT con sustitución “-N” 43.
- 4.3. Evidencias in vivo 43.
 - 4.3.1. Estimulación locomotora 43.
 - 4.3.2. Efectos subjetivos 44.
 - 4.3.3. Autoadministración 45.
 - 4.3.4. Preferencia de lugar condicionada 46.
- 4.4. Evidencias in vitro 47.
 - 4.4.1. Efectos moleculares de los análogos de la BZT 47.
 - 4.4.2. Diferencias entre acciones *in vivo* e *in vitro* 48.

5.- AGONISTAS TAAR-1 51.

- 5.1. Introducción 51.
- 5.2. Receptores asociados a aminas de traza 52.
- 5.3. Bioquímica y farmacología del TAAR 1 53.
- 5.4. Ratones deficientes en TAAR1 56.
- 5.5. Ligandos de TAAR1 y psicofarmacología de drogas de abuso 59.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS 63.

MATERIAL Y METODOS 67.

1. -SUJETOS 69.

2.-TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS 70.

3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA 70

- 3.1. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el AHN-1055 y de su interacción con la cocaína (ver Capítulo 1) 71.

3.2. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el JHW-007 y de su interacción con la metanfetamina (ver Capítulo 3)	71.
3.3. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el R05106017 y de su interacción con la cocaína (ver Capítulo 4a)	72.
3.4. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el R05203648 y R05256390 y de su interacción con la metanfetamina (ver Capítulo 4b)	72.
4. PROCEDIMIENTOS OPERANTES	73.
4.1. Cirugía	74.
4.2. Estudios con AHN-1055 (Capítulo 1-Estudio 2)	75.
4.2.1. Estudios de consumo	75.
4.2.2. Test de recaída inducida por contexto	76.
4.2.3. Estudios de Razón Progresiva	77.
4.3. Estudio de sustitución con AHN-1055 (Capítulo 2-Estudio 1)	77.
4.3.1. Procedimiento de entrenamiento y sustitución	77.
4.3.2. Test de recaída inducida por droga	78.
4.4. Estudios con JHW-007 (Capítulo 3-Estudio 2)	79.
4.4.1. Estudio de consumo	79.
4.4.2. Test de consumo	80.
4.4.3. Test de Razón Progresiva	80.
4.5. Estudios con agonistas TAAR1 (Capítulo 4-Estudios 1 y 3)	80.
4.5.1. Estudio de los efectos del agonista parcial R05203648 en el consumo de cocaína.	80.
4.5.2. Estudio de los efectos de los agonistas parciales TAAR1 R05203648 y R05256390 en el consumo de sacarosa.	81.
5. PREFERENCIA DE LUGAR CONDICIONADA	
(Capítulo 4)	81.
5.1 Preferencia de lugar condicionada inducida por el R05106017 y su interacción con cocaína	81.

6. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS (WESTERN BLOTTING)	83.
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85.
<u>RESULTADOS</u>	87.
Capítulo 1: Estudio sobre el potencial de abuso del inhibidor del transportador de dopamina AHN-1055 y de su influencia en el consumo de cocaína.	89.
Capítulo 2: Prevención de la recaída en el consumo de cocaína mediante un tratamiento sustitutivo con el AHN-1055.	102.
Capítulo 3. Estudio sobre el potencial de abuso del inhibidor del transportador de dopamina JHW-007 y de su influencia en el consumo de metanfetamina.	113.
Capítulo 4: Agonistas TAAR1 y psicoestimulantes.	125.
<u>DISCUSIÓN</u>	135.
<u>CONCLUSIONES</u>	157.
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	161.
<u>ANEXO: PUBLICACIONES</u>	209.

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama descriptivo de la espiral que caracteriza al ciclo adictivo desde una perspectiva psiquiátrica	5.
Figura 2. Esquema del circuito de la recompensa y sus principales proyecciones neurotransmisoras	6.
Figura 3. Esquema representativo de la transferencia del control de la conducta.	10.
Figura 4. Representación de una sinapsis dopaminérgica.	15.
Figura 5. Modelo de preferencia de lugar condicionada empleado.	26.
Figura 6. Paradigma experimental del <i>reinstatement</i> del comportamiento de búsqueda de droga	27.
Figura 7. Estructuras químicas de las moléculas de benzotropina, cocaína y GBR 12909.	41.
Figura 8. Cajas de autoadministración empleadas	74.
Figura 9. Condiciones y material empleado para la cirugía de implantación de la cánula.	75.
Figura 10. Aparato de CPP empleado en los experimentos	82
Figura 11. Efectos inducidos por el AHN-1055 en la actividad locomotora en agudo y en administración combinada con cocaína	96
Figura 12. La cocaína y el AHN-1055 muestran efectos diferenciales en un programa de refuerzo de razón progresiva modificado	97.
Figura 13. Efectos del AHN-1055 en la autoadministración de cocaína y en la respuesta operante mantenida por sacarosa	99.
Figura 14. Efectos diferenciales de la autoadministración de AHN-1055 y de la autoadministración de cocaína en un test de recaída inducido por contexto	101
Figura 15. El tratamiento de sustitución con AHN-1055 conduce a la extinción de las respuestas sobre la palanca activa	108.
Figura 16. La terapia sustitutiva con el análogo AHN-1055 previene el <i>reinstatement</i> de la búsqueda de cocaína	109.
Figura 17. La sustitución con el análogo AHN-1055 produce en ratas la supresión de la expresión de las proteínas c-Fos, BDNF y FADD en el mPrC	111.
Figura 18. Efectos del JHW-007 y de su combinación con metanfetamina sobre la actividad locomotora.	119.
Figura 19. Resultados obtenidos de los ensayos de autoadministración de metanfetamina y del tratamiento con JHW007	121.

Figura 20. Resultados obtenidos de los test bajo un programa de refuerzo de razón progresiva con metanfetamina.	123.
Figura 21: Patrón temporal de la actividad locomotora inducida por los los compuestos R05203648 y R05256390	129.
Figura 22: Efectos sobre la preferencia de lugar condicionada inducida por el agonista total R05166017 (0, 0.3, 1, 3, 10 y 20 mg/kg) y su interacción con cocaína.	130.
Figura 23: Efectos del agonista selectivo completo R05166017 sobre la actividad locomotora inducida por cocaína.	132.
Figura 24: Efectos del compuesto R05203648 sobre la autoadministración de cocaína.	133.
Figura 25: Resultados obtenidos de los test de consumo de sacarosa y Razón Progresiva bajo los efectos de los R05203648 y R05256390	134

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios clínicos controlados llevados a cabo con medicaciones prometedoras para el tratamiento de la adicción a cocaína	35.
Tabla 2. Diseño experimental para el estudio de los efectos de la terapia Sustitutiva	105.

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ADHD	Déficit de atención y trastorno de hiperactividad
AHN-1055	3 α -[bis(4'-fluorofenil)metoxi]-tropano
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BLA	Amígdala basolateral
BZT	Benzotropina
Cg1	Corteza cingulada
CO	Cocaína
CPP	Preferencia de lugar condicionada
CRF	Corticotropina
CSTC	Bucle cortico-estriatal-tálamo-cortical
DAT	Transportador de dopamina
dIPFC	Corteza prefrontal dorsolateral
dmPFC	Corteza Prefrontal dorsomedial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Estriado Dorsal
FR	Razón fija
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
Glu	Glutamato
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GPe	Segmento Externo del Globo Pálido
GPi,	Segmento Interno del Globo Pálido
i.p.	Intraperitoneal

MAO	Monoamino oxidasa
METH	Metanfetamina
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
mPrC	Corteza prefrontal medial
MSN	Neuronas Espinosas Medianas
NAc	Nucleo Accumbens
NE	Norepinefrina
NET	Transportador de norepinefrina
NMDA	Glutamato N-metil-D-aspartato
oPFC	Corteza prefrontal orbitofrontal
PEA	Feniletilamina
PFC	Corteza prefrontal
PR	Razón progresiva
PrLC	Corteza prefrontal prelímbica
SA	Autoadministración
SERT	Transportador de serotonina
SN	Sustancia negra
TAARs	Receptores asociados a aminas de traza
TAs	Aminas endógenas de traza
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas
VTA	Área tegmental ventral

INTRODUCCIÓN

1.- ADICCIÓN A LOS PSICOESTIMULANTES

1.1. Introducción

Las drogas tanto legales (e.g. alcohol o nicotina) como ilegales (e.g. cocaína, anfetamina, metanfetamina, heroína) son consumidas por varias razones incluyendo, a parte de los efectos placenteros que producen, una alteración del estado mental, una mejora en determinados procesos cognitivos y, en ciertas circunstancias, como forma de auto-medicación. El consumo repetido de drogas puede desembocar en un trastorno adictivo, el cual se manifiesta como un intenso deseo de consumir y una pérdida de control de la conducta de consumo, a pesar de las serias consecuencias negativas que se derivan de él.

Las manifestaciones comportamentales aberrantes que ocurren durante el proceso adictivo, han sido consideradas durante mucho tiempo como “elecciones” del individuo adicto. Recientes estudios de neuroimagen han revelado que regiones cerebrales importantes para el funcionamiento correcto de diferentes procesos como la motivación, recompensa y control de los actos, se encuentran alteradas en personas dependientes (Volkow *et al*, 2003). Esto proporciona las bases para un nuevo punto de vista en el que se considera la adicción como una enfermedad del cerebro, y el comportamiento anormal asociado como el resultado de una disfunción del tejido y circuitos cerebrales. Por lo tanto, aunque la experimentación inicial y recreativa con drogas sea un proceso voluntario, una vez la adicción se ha desarrollado, el control del comportamiento está alterado. Aunque los estudios de neuroimagen muestran anomalías específicas en la función cerebral de los individuos afectados, no todos los adictos las muestran.

La exposición prolongada a drogas de abuso es suele ser fundamental para el desarrollo del proceso adictivo y su expresión implica interacciones complejas entre factores ambientales y biológicos. Esto puede explicar el por qué algunos individuos se convierten en adictos y otros no y sugiere que considerar la adicción como un trastorno puramente biológico o puramente ambiental es inexacto. Recientes descubrimientos han incrementado nuestro conocimiento sobre cómo las drogas afectan a la expresión de genes, proteínas y circuitos neuronales (Nestler, 2004) y cómo estos factores biológicos pueden afectar al comportamiento humano. Durante las últimas décadas se han ido construyendo las bases

fundamentales para tener una mejor comprensión de cómo factores ambientales interactúan con factores biológicos y contribuyen al patrón de comportamientos que conducen a la adicción.

1.2. Teorías de la adicción

La transición de consumo ocasional a dependencia está determinada por numerosos factores entre los que encontramos factores genéticos, ambientales, neuroquímicos y modificaciones neuroanatómicas de los circuitos cerebrales como resultado de la administración repetida de drogas (Li *et al*, 2011). Durante las primeras fases, las drogas actúan como reforzadores positivos y su consumo se atribuye a la capacidad de inducir un estado emocional placentero y recompensante, que puede derivar en un consumo crónico o dependencia a la droga (Stolerman, 1992; Wise, 1980). Gran parte de las investigaciones se han centrado en el estudio de los mecanismos moleculares y neuroanatómicos de los efectos recompensantes y reforzantes de la drogas al inicio del consumo. Sin embargo, investigaciones más recientes de los cambios moleculares y neuroanatómicos a largo plazo, han revelado que el proceso adictivo implica una compleja red de sistemas cerebrales más allá del aceptado circuito de la recompensa.

Robinson y Berridge hipotetizaron que la administración repetida de drogas producía alteraciones en el sistema de la recompensa y sistemas de aprendizaje asociativo, de manera que el individuo comienza a incrementar la sensibilidad tanto por la droga como por los estímulos ambientales asociados a ella, dando lugar a una búsqueda compulsiva o *wanting* (Robinson and Berridge, 1993). Koob y Le Moal postularon que el consumo repetido de drogas y la dependencia era resultado de una disminución en el funcionamiento del sistema de la recompensa asociado a un incremento en la implicación de los circuitos cerebrales que controlan el estrés o los efectos no recompensantes (Koob and Le Moal, 1997). Se ha hipotetizado que estos dos neurocircuitos contrapuestos interactúan de una manera cíclica, dando lugar en último término al proceso adictivo (Koob *et al*, 1997). Everitt y Robbins (Everitt and Robbins, 2005) postularon en su teoría del aprendizaje de hábitos, que durante el proceso adictivo se produce una

transferencia desde un consumo voluntario y controlado a un consumo compulsivo e involuntario, de manera que la conducta de consumir drogas acaba transformándose en una conducta automática o hábito. El control del comportamiento inicialmente controlado por la región de la corteza prefrontal (PFC) y el estriado ventral, se va transfiriendo hacia regiones más dorsales de los ganglios de la base. Finalmente, Hyman y sus colaboradores propusieron la idea de la adicción es un trastorno caracterizado por el secuestro o apropiación de procesos normales de aprendizaje y memoria implicados en la búsqueda de recompensa y asociaciones droga-estímulo (Hyman, 2005).

Estas teorías coinciden en que la adicción se caracteriza por la progresión desde un estado inicial en el que el individuo tiene el control sobre el consumo a estados más avanzados en los que el individuo ha perdido este control y ha pasado a una búsqueda y consumo compulsivos. Esta progresión parece estar mediada por alteraciones inducidas por las mismas drogas, en los circuitos que subyacen a la recompensa, la función ejecutiva, el aprendizaje y la memoria.

1.3. Adicción: un trastorno del desarrollo

Durante el desarrollo normal de un individuo existen determinados periodos de tiempo en los que el riesgo de consumir drogas puede ser más elevado que en otros. La experimentación y adicción normalmente comienzan en la adolescencia (Wagner and Anthony, 2002). Comportamientos específicos típicamente adolescentes, como el riesgo o la búsqueda de novedad, incrementan la probabilidad de experimentar con sustancias legales e ilegales (Spear, 2000), las cuales pueden reflejar un desarrollo cerebral incompleto de determinadas regiones como por ejemplo una mielinización de regiones del lóbulo frontal implicadas en procesos de control ejecutivo y motivación. Además, diferentes estudios han revelado que la exposición a drogas durante la adolescencia puede derivar en diferentes neuroadaptaciones. Por ejemplo en ratones, la exposición a nicotina durante el periodo de su desarrollo que corresponde con la adolescencia en humanos, pero no durante la fase adulta produce cambios en los receptores de nicotina y un incremento en el valor reforzante de esta droga en fases posteriores de la vida (Adriani *et al*, 2003).

1.4. El ciclo adictivo

La adicción no es un proceso estático y así como otros trastornos del comportamiento como la adicción al juego o los atracones de comida, hay diferentes componentes que constituyen el ciclo patológico. Derivado de la psicología social, en el ciclo adictivo se han descrito tres componentes: obsesión/anticipación, atracón/intoxicación y abstinencia/efectos negativos (Koob *et al*, 1997). Estos tres estados se integran en una espiral que ha sido descrita como un proceso de desregulación del sistema cerebral de la recompensa en el contexto del ciclo repetido de la adicción (Figura 1). Constructos psiquiátricos y psicológicos hacen referencia al mismo ciclo de adicción, y modelos animales han sido establecidos y validados para los diferentes síntomas asociados con elementos de dicho ciclo (Ahmed and Koob, 1998; APA, 2013; Markou *et al*, 1993). Superpuestos en el ciclo de la adicción hay varios elementos de refuerzo que pueden contribuir al uso compulsivo de drogas durante el curso de la adicción. El refuerzo positivo se produce cuando la presentación de la droga incrementa las probabilidades de responder para volver a obtenerla otra vez. Estos efectos positivos de las drogas cuando son descritos en el contexto de la recompensa a menudo son equiparables con la sensación placentera obtenida tras el consumo. Los refuerzos negativos, por el contrario, hacen referencia al alivio que se experimenta al volver a consumir la droga tras un periodo de abstinencia en el que se advierte un estado aversivo (Wikler, 1973).

Refuerzos positivos secundarios pueden ser obtenidos a través de un refuerzo positivo condicionado, como puede ser la asociación previa de determinados estímulos neutros con los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso. Efectos negativos secundarios pueden ser obtenidos a través de la eliminación de los efectos reforzantes negativos condicionados de la abstinencia condicionada. Los refuerzos positivos se han relacionado con el estado de ingesta e intoxicación, mientras que los refuerzos negativos han sido asociados con la fase de abstinencia (Figura 1). Los refuerzos secundarios, tanto positivos como negativos, contribuyen a la fase de obsesión y anticipación.



Figura 1. Diagrama descriptivo de la espiral que caracteriza al ciclo adictivo desde una perspectiva psiquiátrica. Modificado de Koob GF & LeMoal MD (2001)

Las bases neurobiológicas de los efectos reforzantes positivos agudos, los efectos reforzantes negativos, los efectos reforzantes condicionados asociados con la abstinencia y la recaída, han proporcionado información relevante para conocer mejor el proceso adictivo (Markou *et al*, 1993). Sin embargo, relacionando los modelos animales con diferentes criterios utilizados para el diagnóstico, la dependencia de sustancias en humanos requiere de una explicación más profunda para comprender como se pasa del uso esporádico al abuso y pérdida de control. Dicha transición ocurre entre un acceso limitado y controlado de la droga y un uso compulsivo. La hipótesis más plausible es que la adicción no solo implica cambios en los sustratos neurales del refuerzo positivo si no que otros sistemas neuroadaptativos están involucrados, fundamentalmente relacionados con la recompensa. Se piensa que estos cambios contribuyen a un estado alostático que hace al organismo vulnerable para caer en la espiral patológica de la adicción.

1.5. El circuito de la adicción

El circuito de la recompensa subyace a todos los comportamientos motivados tanto por refuerzos naturales como comida, agua o sexo, así como por drogas de abuso. Algunas de las regiones cerebrales claves del sistema de la recompensa son el Área Tegmental Ventral (VTA), Núcleo Accumbens (NAc),

corteza prefrontal (PFC), ganglios de la base, estriado dorsal, amígdala e hipocampo (Figura 2).

Los efectos reforzantes de las drogas y la progresión desde el inicio del consumo hasta la dependencia, son aspectos altamente dependientes de complejas interacciones y adaptaciones entre las drogas y las citadas regiones. El principal neurotransmisor en mediar la recompensa es la dopamina (DA). Sin embargo, los psicoestimulantes también incrementan los niveles extracelulares de glutamato (Glu), norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) y otros neurotransmisores que contribuyen a muchos de los cambios comportamentales y moleculares observados a largo plazo y que subyacen al proceso de adicción (Hyman and Malenka, 2001; Kalivas, 2009).

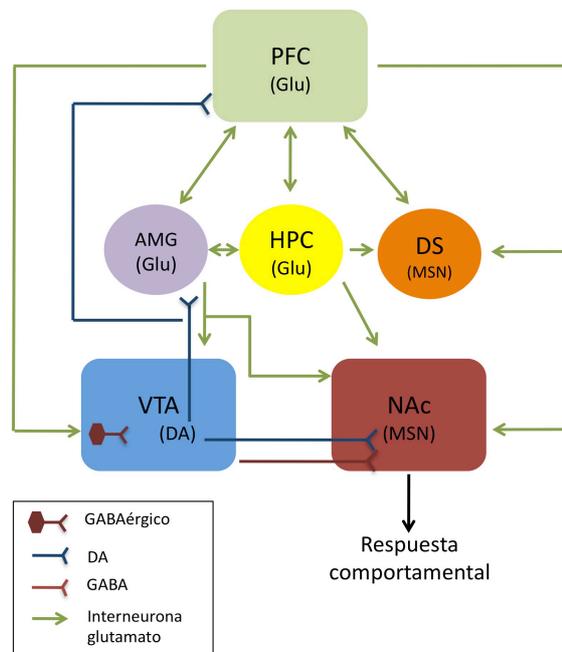


Figura 2. Esquema del circuito de la recompensa y sus principales proyecciones neurotransmisoras. Modificado de Sara B Taylor, Candace R Lewis & M Foster Olive (2013)

Abreviaturas: AMG, amígdala; DA, neuronas dopaminérgicas; DS, estriado dorsal; GABA, ácido aminobutírico; Glu, neuronas glutamatérgicas; NAc, Núcleo Accumbens; PFC, Corteza Prefrontal; VTA, Área Ventral Tegmental.

1.5.1 Sistema de la recompensa:

Área Tegmental Ventral

Funcionalmente el sistema de la recompensa se origina en VTA, región donde se concentran una gran cantidad de cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas que emiten proyecciones al NAc y otras regiones cerebrales como la PFC y amígdala. Muchas de las recompensas naturales y las drogas de abuso activan estas neuronas dopaminérgicas del VTA y liberan DA en estas regiones (Di Chiara and Imperato, 1988; McClure *et al*, 2003; Robinson *et al*, 1993; Taber and Fibiger, 1997). El VTA esta también modulado por inputs glutamatérgicos procedentes de la PFC y amígdala, además de por una subpoblación de interneuronas inhibitorias GABAérgicas (Johnson and North, 1992). Recientes evidencias han sugerido también que inputs a VTA que liberan un péptido relacionado con el estrés, el facto de liberación de corticotropina (CRF), pueden ser responsables en modular los efectos inducidos por el estrés sobre la búsqueda de drogas. Por otro lado, los inputs a VTA que contienen orexina procedentes de regiones hipotalámicas, pueden estar implicados en comportamientos relacionados con la recaída (Mahler *et al*, 2013; Wang *et al*, 2005). Estas interacciones entre neurotransmisores y neuropéptidos pueden dar lugar a numerosos cambios celulares y moleculares qque contribuyen al aprendizaje asociado con la recompensa y al desarrollo de la adicción (Jay, 2003).

Núcleo Accumbens

Muchas de las drogas de abuso y particularmente los psicoestimulantes inducen la liberación de DA a nivel de las terminales nerviosas del NAc, PFC y amígdala (Koob and Volkow, 2010). La liberación de DA en el NAc parece ser crucial para la inducción de los efectos reforzantes de las drogas. El NAc, localizado en el estriado ventral, está formado principalmente por neuronas espinosas medianas GABAérgicas (MSN). Funcionalmente puede dividirse en dos subregiones diferentes, *core* y *shell*, las cuales responden a los efectos de las drogas también de forma diferente y parecen mediar en distintos aspectos del proceso adictivo. La liberación de DA en el *shell* contribuye al estado recompensante inicial y a los efectos reforzantes de las drogas, mientras que la liberación en el *core* parece estar más asociada con la expresión de los comportamientos aprendidos en

respuesta a estímulos recompensantes (Di Ciano and Everitt, 2001; Everitt *et al*, 2008). La elevación de la DA extracelular inducida por drogas en el NAc y otras regiones cerebrales del sistema de la recompensa, está modulada por otros sistemas neurotransmisores, incluyendo ácido gamma aminobutírico (GABA), Glu, opioides endógenos y cannabinoides, 5-HT, NE y varios neuropéptidos como CRF (Hyman *et al*, 2001; Kalivas, 2009; Koob, 1992; Koob *et al*, 2010; Serrano and Parsons, 2011). Además estos sistemas de neurotransmisores pueden modular el consumo y la búsqueda de drogas. Por ejemplo, receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos tanto en el NAc *core* como en el *shell*, median el reestablecimiento (*reinstatement*) de búsqueda de cocaína inducido por contexto (Xie *et al*, 2012).

1.5.2. Funciones ejecutivas y sistema de hábitos:

Cortex Prefrontal

La PFC es un principal regulador de procesos emocionales y cognitivos que contiene diversas subregiones funcionalmente distintas. La PFC dorsolateral (dlPFC), PFC orbitofrontal (oPFC) y el cortex cingulado están implicados en la atribución de la saliencia, en la inhibición de comportamientos inapropiados, en la flexibilidad comportamental y cognitiva y en la regulación de la emoción (Breiter *et al*, 1997; Bush *et al*, 2002; Volkow *et al*, 2011). Estas regiones de la PFC tienen densas poblaciones de cuerpos celulares de neuronas glutamatérgicas con vías eferentes que proyectan a las MSN del NAc que recibe también las vías dopaminérgicas del VTA (Sesack and Pickel, 1992). Estas eferencias glutamatérgicas proyectan también a la amígdala, VTA y estriado dorsal e indirectamente al hipocampo (Kalivas and Volkow, 2005; Sesack *et al*, 1989). La PFC modula los efectos recompensantes de las drogas de abuso y el comportamiento de búsqueda, así como la recaída en el consumo (Lasseter *et al*, 2010). Coordina también la flexibilidad con la que un organismo adapta su comportamiento dirigido a meta en muchos de los estados del proceso adictivo.

Estriado dorsal y bucles corticales-ganglios de la base

Regiones de los ganglios de la base que incluyen la parte dorsal y ventral del estriado, segmentos interno y externo del globo pálido (GPi, GPe), núcleo

subtalámico y los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN), se encuentran altamente implicados no solo en el control motor fino sino también en la función de la PFC (Kopell and Greenberg, 2008).

En general, la salida de los ganglios de la base se produce principalmente vía tálamo, el cual proyecta de vuelta a la PFC formando el bucle cortico-estriatal-tálamo-cortical (CSTC). Tres bucles CSTC se han propuesto como moduladores de la función ejecutiva e inhibición del comportamiento. En el circuito prefrontal dorsolateral, los ganglios de la base principalmente modulan la identificación y selección de objetivos, incluyendo las recompensas (Feil *et al*, 2010). El circuito oPFC modula la toma de decisiones y la impulsividad y el circuito del cíngulo anterior modula la valoración de las consecuencias (Feil *et al*, 2010). Todos estos circuitos están controlados por inputs dopaminérgicos procedentes de VTA hasta por último guiar comportamientos relevantes para la adicción, incluyendo la persistencia y reducción del repertorio de comportamientos hacia la búsqueda de drogas, y continuado consumo a pesar de las consecuencias negativas (Feil *et al*, 2010; Kopell *et al*, 2008; Sesack *et al*, 2003).

El estriado dorsal, también denominado caudado-putamen en primates, está asociado con transiciones desde comportamientos dirigidos a meta hasta el consumo automático o hábito, debido en parte a su papel en el aprendizaje estímulo-respuesta (Everitt *et al*, 2008). Como se ha descrito anteriormente, los efectos recompensantes y reforzantes en la fase inicial del consumo de drogas de abuso, están mediados por incrementos en el nivel extracelular de DA en el *shell* del NAc, a los que sigue posteriormente un incremento en el *core* (Di Chiara *et al*, 2004; Ito *et al*, 2004). Tras un periodo prolongado de consumo, las claves asociadas producen incremento en los niveles extracelulares de DA en el estriado dorsal pero no en el NAc (Ito *et al*, 2002). Es necesario recordar que durante el proceso adictivo se produce un desplazamiento de la implicación desde el estriado ventral al dorsal que hace referencia a la progresión desde un estado de consumo inicial voluntario a un estado final compulsivo e involuntario o automático (Everitt *et al*, 2008) (Figura 3). Evidencias recientes han indicado que la transmisión glutamatérgica en el estriado dorsal es importante en las adaptaciones y plasticidad inducida por las drogas en esta región cerebral (Grueter *et al*, 2012).



Figura 3. Esquema representativo de la transferencia del control de la conducta. En una primera fase en la que el comportamiento es controlado por regiones prefrontales y estriado ventral, éste se va transfiriendo a regiones más dorsales de los ganglios de la base mediante una serie de bucles. De esta manera, conforme se va avanzando en el consumo de drogas y éste se va haciendo más prolongado, la acción pasa a estar controlada por mecanismos estímulo-respuesta llegando a convertirse en un hábito o acción automática. Figura modificada de Everitt & Belin (2008).

1.5.3. Sistemas de aprendizaje y memoria

Hipocampo

El hipocampo está implicado en la correcta función de la memoria espacial, en parte debido a su importante implicación en la integración de claves o información contextual o ambiental (Jarrard, 1995). El subículum ventral, la principal salida del hipocampo, proyecta a varias regiones límbicas, incluyendo el NAc y estriado dorsal. Se ha demostrado que el subículum ventral juega un papel importante en el comportamiento de búsqueda de drogas, sugiriendo la importancia de la información contextual en la adicción a psicoestimulantes (Sun and Rebec, 2003). Además, la vía desde el subículum ventral al NAc se ha visto implicada en la sensibilización, dependiente de DA, a los psicoestimulantes (Goto and Grace, 2005; Lodge and Grace, 2008). Recientemente se ha demostrado que la conexión entre la región CA3 del hipocampo y VTA, puede también mediar la capacidad de la información contextual de modular comportamientos

motivacionales (Luo *et al*, 2011). Como demostraron los estudios de microinyección llevados a cabo por Fuchs y colaboradores, la transmisión glutamatérgica en el hipocampo dorsal está involucrada en la conducta de búsqueda de cocaína inducida por contexto (Xie *et al*, 2010).

Amígdala

La amígdala ejerce un papel prominente en el aprendizaje condicionado, en el que se establecen fuertes asociaciones entre los estímulos ambientales y los efectos reforzantes de las drogas de abuso. Eferencias glutamatérgicas desde la amígdala al PFC, NAc e hipocampo median respuestas comportamentales frente a estos estímulos (Cardinal *et al*, 2002; McGaugh, 2002; Petrovich *et al*, 2001). La amígdala está formada por múltiples núcleos implicados en diferentes aspectos de la adicción relacionados con el aprendizaje asociativo. El neuropéptido CRF en el núcleo central de la amígdala media en varios aspectos de comportamientos motivados por estrés relevantes en el proceso adictivo (Koob, 2010; Zorrilla *et al*, 2012). La región basolateral de la amígdala es crítica para la recaída inducida por estímulos condicionados, mientras que el núcleo central es un sustrato neural clave implicado en la recaída inducida por estrés (Everitt and Wolf, 2002; Shalev *et al*, 2002). Las conexiones recíprocas entre la amígdala basolateral y el cortex cingulado anterior pueden ser particularmente importantes para la recaída en el consumo de cocaína inducido por estímulos condicionados (Childress *et al*, 1999; Kilts *et al*, 2001). Es importante resaltar que tanto la amígdala como el subículo ventral tienen conexiones recíprocas y se ha visto que proyectan a la misma población de neuronas en el NAc (French *et al*, 2003a; French and Totterdell, 2003b). Esto indica que las salidas desde la amígdala e hipocampo interactúan y convergen para modular el circuito de la recompensa y potenciar las asociaciones recompensa-contexto y recompensa-claves que contribuyen a la recaída.

1.6. Efectos agudos de los psicoestimulantes

1.6.1. Efectos subjetivos y farmacocinéticos

Los psicoestimulantes se asocian con una sensación de euforia, incremento en la confianza en uno mismo y energía, desvelo y actividad y un descenso de la sensación de fatiga y apetito (Cruickshank and Dyer, 2009; Hando *et al*, 1997). Los

efectos adrenérgicos de estas drogas incluyen una elevación en la tasa cardiaca y respiratoria, presión arterial, temperatura corporal y sudoración, además de incrementar el temblor y exageración de los reflejos (Ciccarone, 2011; Cruickshank *et al*, 2009; Rusyniak, 2013). Aunque diferentes clases de psicoestimulantes inducen similares efectos subjetivos cuando son consumidos, sus propiedades farmacocinéticas son muy diferentes. La cocaína tiene una vida media muy corta comprendida entre 30 minutos y 2 horas y un pico máximo de efectos subjetivos dependiente de la ruta de administración (Jufer *et al*, 2000). Cuando la cocaína es esnifada, sus efectos son notables a los 10-15 minutos, mientras que inyectada el efecto es mucho más rápido (3-4 minutos) (Hatsukami and Fischman, 1996; Volkow *et al*, 2000). La cocaína base o *crack* fumada es mucho más adictiva debido principalmente a su rápido modo de acción (1-2 minutos) (Hatsukami *et al*, 1996; Volkow *et al*, 2000). Por otra parte, la metanfetamina puede ser administrada por vía oral, intravenosa o ser fumada. Al igual que la cocaína, fumada produce una sensación de euforia o *high* mucho más rápida, presentando un elevado potencial de abuso (Kish, 2008). Su vida media es mucho más larga que la de la cocaína llegando a las 10-12 horas (Harris *et al*, 2003a). La anfetamina se suele administrar principalmente vía oral o intravenosa y su vida media también puede llegar a las 10-14 horas.

1.6.2. Mecanismos de acción

Como se ha comentado anteriormente, un efecto neurobiológico común de muchas drogas de abuso es la modulación directa o indirecta de los cuerpos celulares de la neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAc, produciendo el incremento de los niveles extracelulares de DA en esa región (Berke and Hyman, 2000; Di Chiara *et al*, 1988; Robinson and Becker, 1986; Wise and Rompre, 1989). Sin embargo, no todas las drogas de abuso actúan directamente sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA a nivel de los cuerpos celulares. Los psicoestimulantes pueden ejercer sus efectos interaccionando con los transportadores de monoaminas de membrana y vesiculares localizados en las terminales presinápticas en el NAc (Rudnick and Clark, 1993). La cocaína se une a los transportadores de DA (DAT), NE (NET) y 5-HT (SERT) e inhibe su función, produciendo un incremento en la concentración extracelular de estos

neurotransmisores en el NAc (Ritz *et al*, 1990). En ratones transgénicos que carecen de DAT, la administración de cocaína no incrementó la actividad locomotora o los niveles de DA en el estriado, a pesar de que estos animales pudieron aprender a autoadministrarse cocaína principalmente debido a la acción sobre los transportadores de NE y 5-HT (Giros *et al*, 1996; Rocha, 2003; Rocha *et al*, 1998).

Las anfetaminas, incluyendo la metanfetamina, ejercen sus efectos de una manera más compleja. Además de bloquear los transportadores de DA, NE y 5-HT, las anfetaminas son capaces de revertir el transporte del DAT, resultando en un incremento de los niveles extracelulares de DA, además de NE y 5-HT. La anfetamina puede penetrar en la neurona presináptica bien a través del DAT o difundiendo a través de la membrana plasmática, de manera que se acumula en el citosol (Zaczek *et al*, 1991). Una vez en el interior de la célula, producen la redistribución de monoaminas desde las vesículas sinápticas donde se encuentran almacenadas al citosol (Schmitz *et al*, 2001; Sulzer *et al*, 2005). Se han descrito varios mecanismos que intentan explicar como se produce la redistribución. Dos de las principales hipótesis indican que las anfetaminas actúan como sustratos sobre los transportadores de monoaminas (VMAT2) o bien que actúan como bases débiles que alteran el gradiente de pH vesicular (Sulzer *et al*, 2005). Además, las anfetaminas prolongan la transmisión monoaminérgica inhibiendo la acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO), incrementando la concentración de DA disponible en el citosol para ser liberada (Fung and Uretsky, 1982; Larsen *et al*, 2002; Robinson, 1985)(Figura 4). Mientras que los niveles de NE y 5-HT también se incrementan en el NAc como consecuencia del consumo de psicoestimulantes, el incremento extracelular de DA tiene un papel crucial en las propiedades reforzantes y recompensantes de los psicoestimulantes (Rocha, 2003), aunque es interesante el hecho de que tanto la anfetamina como metanfetamina producen una liberación más potente de NE que de DA o 5-HT (Rothman *et al*, 2001).

1.6.3. Neurofarmacología relacionada con el abuso de psicoestimulantes

Los psicoestimulantes han sido definidos como una clase de droga que estimula el sistema nervioso central y periférico. El uso irresponsable de psicoestimulantes representa uno de los mayores problemas de salud pública. La

cocaína es ampliamente reconocida como una de las drogas más adictivas y peligrosas que se consumen. Una gran cantidad de artículos científicos evidencian la importancia de las monoaminas en las propiedades adictivas y efectos farmacológicos de los psicoestimulantes. En concreto, la DA juega un papel principal en el refuerzo y efectos comportamentales estimulantes de los psicoestimulantes, tanto en animales como en humanos. Aunque estos efectos no parecen ser directamente dependientes de la 5-HT, estudios de combinación de drogas claramente demuestran que la modulación farmacológica del sistema serotoninérgico puede alterar los efectos comportamentales y neuroquímicos de los psicoestimulantes.

De manera análoga, la NE no parece tener un papel importante en los efectos reforzantes de los psicoestimulantes, pero drogas que incrementan la concentración de NE pueden compartir efectos interoceptivos con los psicoestimulantes, como se ha evidenciado mediante estudios de discriminación de drogas. Recientes evidencias han implicado también a la NE en el reestablecimiento (*reinstatement*) de la conducta extinguida de autoadministración (SA) de psicoestimulantes inducida bien por estrés o por drogas. Por último, hay una línea creciente de evidencias que remarcan la existencia de interacciones complejas entre otros sistemas de neurotransmisores.

El sistema glutamatérgico cortical está implicado en la regulación de la función dopaminérgica. De la misma manera, el sistema GABA ejerce una modulación inhibitora sobre la función glutamatérgica y monoaminérgica. El abuso y adicción a las drogas es un trastorno altamente complejo, por lo que no es sorprendente que los sustratos neurobiológicos que subyacen al consumo y dependencia de psicoestimulantes, implique a una extensa red de sistema neurotransmisores.

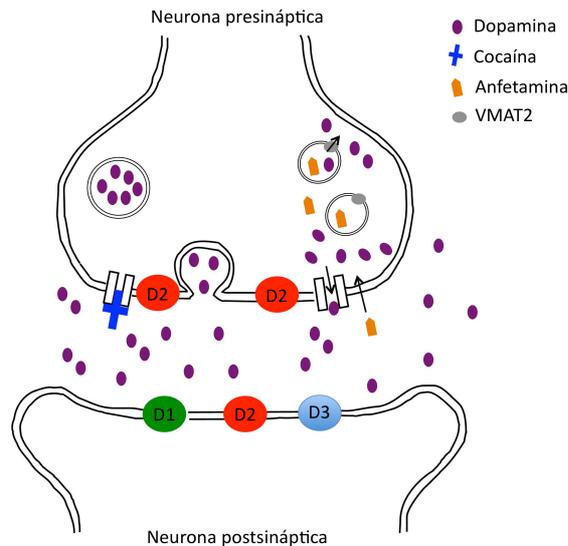


Figura 4. Representación de una sinapsis dopaminérgica.

La cocaína bloquea el transportador de DA, de manera que ésta no puede ser recaptada por la célula y almacenarse en vesículas en el interior de la neurona presináptica (parte izquierda diagrama). La anfetamina (parte derecha del diagrama), puede penetrar en la célula bien a través del DAT o difundiendo a través de la membrana. Una vez en el interior de la célula, interacciona con el transportador de las vesículas donde se encuentra almacenada la DA, los VMAT, facilitando la expulsión del neurotransmisor al citoplasma. El incremento de la concentración de DA en el espacio citoplasmático promueve el transporte inverso del DAT, de manera que se acumula en la hendidura sináptica. Figura modificada de Howell 2007.

Estudios *in vivo* han demostrado que los psicoestimulantes pueden interactuar con múltiples transportadores de monoaminas. Sin embargo, los efectos comportamentales de los psicoestimulantes asociados con sus propiedades adictivas se han relacionado fundamentalmente con un incremento en la actividad dopaminérgica. El sistema dopaminérgico mesolímbico comprende neuronas dopaminérgicas originadas en VTA que proyectan a varias estructuras límbicas y corticales, incluyendo el NAc, amígdala y PFC (Tzschencke, 2001; Tzschencke and Schmidt, 2000). El incremento en la concentración extracelular de DA en el sistema mesocorticolímbico (MCL) inducido por las drogas es crítico en la inducción de los efectos comportamentales de los psicoestimulantes. Dos familias de receptores, familia D1 (receptores D1 y D5) y la familia D2 (receptores D2, D3 y D4) han sido descritos (Civelli *et al*, 1991) y se ha evidenciado que ambas están implicadas en

los efectos de la cocaína relacionados con el consumo (Mello and Negus, 1996; Spealman *et al*, 1992; Woolverton and Johnson, 1992). Evidencias obtenidas de una gran variedad de estudios de comportamiento que caracterizaban los efectos agudos de agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la captura y antagonistas de la DA, administrados tanto solos como combinados con cocaína y otros psicoestimulantes, han apoyado esta conclusión.

La relevancia del DAT en las propiedades reforzantes de la cocaína está respaldada por estudios de neuroimagen realizados en humanos y primates no humanos. En pacientes consumidores de cocaína, se ha establecido una correlación significativa entre la ocupación del DAT y los efectos subjetivos reportados por los sujetos tras la administración de la droga (Volkow *et al*, 1997) o de metilfenidato (Volkow *et al*, 1999). El rango de dosis consumidas en humanos resultan en una ocupación del transportador de entre el 67-69% en babuinos (Volkow *et al*, 1996a). Dosis de cocaína que mantienen una tasa de respuesta elevada en estudios de SA, presentan una tasa de ocupación entre el 65-76% en monos *Rhesus* (Lindsey *et al*, 2004; Wilcox *et al*, 2002). La ocupación del DAT también ha sido determinada con inhibidores del transporte de DA que han mostrado efectividad en reducir la SA de cocaína. Dosis de GBR 12909 que disminuyen la SA de cocaína en monos *Rhesus* tienen una ocupación del DAT mayor del 50% en babuinos y monos *Rhesus* (Lindsey *et al*, 2004). De forma análoga, dosis de feniltropano, un derivado de la cocaína con alta afinidad por el DAT, disminuyó la SA de cocaína en monos *Rhesus* con ocupaciones del transportador de entre 72-84% (Lindsey *et al*, 2004; Wilcox *et al*, 2002). En conjunto, estos datos indican que la ocupación del DAT es un factor determinante importante de los efectos reforzantes de la cocaína y de la efectividad de los inhibidores de la captura de DA en reducir la SA de cocaína.

1.7. Efectos crónicos de los psicoestimulantes

Como se ha explicado, el proceso adictivo es considerado como un proceso que evoluciona desde un consumo ocasional hasta un consumo incontrolado o hábito. Esta evolución en el proceso sugiere que diferentes adaptaciones neurobiológicas deben estar implicadas en los diferentes estados que constituyen la adicción. Cambios a largo plazo puede ocurrir tras un consumo prolongado de la droga, como por ejemplo deficiencias en el comportamiento y cognición,

conectividad funcional disregulada, alteración en la expresión de receptores, transportadores y en la liberación y síntesis de neurotransmisores.

Es importante mencionar que no todos los individuos que experimentan con los efectos de las drogas acabarán desarrollando una adicción. Factores individuales, como la vulnerabilidad genética, la impulsividad, el estado económico, experiencias previas o el estrés, predisponen a desarrollar o no el proceso adictivo.

La exposición repetida a psicoestimulantes puede conducir a cambios robustos y duraderos en los sustratos neurobiológicos así como a cambios en la sensibilidad de los efectos neuroquímicos y comportamentales inducidos por las drogas. Una sensibilidad de los efectos disminuida durante exposiciones repetidas a la droga es indicativo del fenómeno de tolerancia, mientras que un incremento es indicativo de sensibilización. Ambos procesos se desarrollan como consecuencia de la administración crónica de psicoestimulantes. La mayor parte de los estudios en modelos animales se han centrado en la sensibilización a los efectos estimulantes locomotores. Drogas como la cocaína y la anfetemina pueden producir sensibilización en roedores, generalmente identificada como un incremento gradual de la actividad locomotora o comportamientos estereotipados (Robinson and Berridge, 2000). Este fenómeno ha sido propuesto como un modelo general de plasticidad neuronal por el cual los cambios comportamentales inducidos por las drogas pueden relacionarse con los cambios en los mecanismos moleculares.

Hay muchas evidencias acerca de que el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y sus inputs excitatorios glutamatérgicos son críticos para el desarrollo de la sensibilización a los efectos comportamentales de los psicoestimulantes (Carlezon and Nestler, 2002; Wolf *et al*, 2004). Estudios de microinyección de drogas en determinadas áreas cerebrales, han indicado que el VTA, una región rica en cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas, juega un papel clave en el desarrollo de la sensibilización. Por el contrario, el NAc, el área de mayor proyección dopaminérgica desde VTA, parece estar más relacionado con la expresión de este proceso. Por ejemplo, inyecciones de antagonistas del receptor D1 o receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), en VTA pueden interrumpir el proceso de desarrollo de la sensibilización. Sin embargo,

antagonistas NMDA no bloquean su expresión (Wolf and Jeziorski, 1993). De forma similar, antagonistas dopaminérgicos pueden bloquear el desarrollo de la sensibilización a los psicoestimulantes sin bloquear su expresión (Weiss *et al*, 1989). Las aferencias glutamatérgicas desde el PFC a VTA y NAc se han implicado tanto en el desarrollo como en la expresión de la sensibilización a cocaína y anfetamina (Wolf *et al*, 1995). En los animales que muestran sensibilización se ha observado un incremento en los niveles extracelulares de glutamato y DA en el NAc inducidos por la drogas (Kalivas and Duffy, 1993; Pierce *et al*, 1996). En conjunto, no hay una evidencia convincente que sugiera que las eferencias glutamatérgicas procedentes de la PFC produzcan alteraciones en VTA que medien el desarrollo de la sensibilización, ni que las adaptaciones del NAc sean necesarias para su expresión.

1.8 Implicación de otros sistemas neurotransmisores en los efectos inducidos por los psicoestimulantes

1.8.1. Sistema serotoninérgico

El sistema dopaminérgico es una diana importante sobre la que actúan los psicoestimulantes, aunque estudios preclínicos recientes han indicado que el sistema serotoninérgico puede modular también de forma efectiva los efectos comportamentales de la cocaína y anfetamina. A pesar de que los compuestos que incrementan selectivamente la transmisión serotoninérgica carecen de efectos estimulantes y no mantienen una tasa de SA fiable (Howell and Byrd, 1995) una relación negativa ha sido observada entre la potencia de diferentes drogas similares a la cocaína y anfetamina en estudios de SA y su afinidad para unirse a los sitios de captura de 5-HT (Ritz *et al*, 1987). La coadministración de agentes que producen fuertes incrementos en la liberación de DA y 5-HT, producen mínimos efectos estimulantes (Baumann *et al*, 2000) y no mantienen tasas de SA en roedores (Glatz *et al*, 2002). De la misma manera, sustancias que producen la liberación de monoaminas, disminuyen la eficacia reforzante en monos *Rhesus* cuando la potencia de liberación de 5-HT es incrementada en relación a la de DA (Wee *et al*, 2005).

Los sistemas cerebrales serotoninérgicos están idealmente situados para modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas y los efectos

comportamentales de los inhibidores de la captura de DA como la cocaína. Neuronas serotoninérgicas procedentes del núcleo dorsal y medial del rafe, inervan los cuerpos celulares y regiones terminales de neuronas dopaminérgicas del sistemas mesolímbico y nigroestriatal. La convergencia de neuronas serotoninérgicas y neuronas dopaminérgicas se ha visualizado en el VTA y NAc empleando técnicas de microscopía electrónica (Herve *et al*, 1987; Phelix and Broderick, 1995). La 5-HT puede actuar sobre los cuerpos celulares para disminuir la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas o sobre las terminales para disminuir la liberación de DA. En cualquiera de los dos casos, la capacidad de la 5-HT para atenuar los efectos comportamentales de la cocaína, puede deberse a una capacidad de disminuir la elevación extracelular de DA inducida por la droga.

Hay un consenso general acerca de que la estimulación de receptores 5-HT_{2C} inhiben la función del sistema mesolímbico dopaminérgico (Di Matteo *et al*, 2001). La tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas en el VTA está disminuía por inhibidores de la captura de 5-HT (Di Mascio *et al*, 1998) y por agonistas selectivos del receptor 5-HT_{2C} (Prisco *et al*, 1994), resultando en un decremento del nivel de DA en el NAc (Di Matteo *et al*, 2000). Por el contrario, antagonistas selectivos del receptor 5-HT_{2C}, incrementan la actividad de estas neuronas conduciendo a un incremento en la liberación de DA en el NAc (Di Matteo *et al*, 1999). Desde que se descubrió que los receptores 5-HT_{2C} parecen estar localizados exclusivamente en neuronas GABA (Eberle-Wang *et al*, 1997), los efectos de su estimulación parecen estar mediados indirectamente por un incremento en la inhibición de las neuronas dopaminérgicas del VTA mediada por GABA. La localización puede explicar también los controvertidos resultados obtenidos en estudios electrofisiológicos, neuroquímicos y comportamentales.

Algunos estudios que investigan las interacciones entre la 5-HT y la DA han concluido que la primera puede ejercer una influencia excitatoria sobre la actividad dopaminérgica (Cameron and Williams, 1994). La estimulación de los receptores 5-HT_{1B} puede incrementar el efecto reforzante de la cocaína (Parsons *et al*, 1998) por disminución de la inhibición en VTA mediada por GABA (Cameron *et al*, 1994). Los receptores 5-HT₃ también parecen jugar un papel facilitador en los efectos comportamentales de los agonistas dopaminérgicos (Kankaanpaa *et al*, 1996; Layer *et al*, 1992). Esta discrepancia en los resultados son reflejo de la

complejidad de las interacciones entre los dos tipos de sistemas neurotransmisores y los subtipos de receptores serotoninérgicos influenciados por la administración de drogas.

1.8.2. Sistema noradrenérgico

El sistema noradrenérgico tiene conectividad anatómica y funcional con el sistema dopaminérgico. Hay una importante inervación noradrenérgica al *shell* del NAc (Berridge *et al*, 1997; Delfs *et al*, 1998). El locus coeruleus pueden incrementar la actividad de las neuronas dopaminérgicas, efecto que puede ser bloqueado por antagonistas del receptor adrenérgico $\alpha 1$ (Liprando *et al*, 2004). Además lesiones de esta región cerebral pueden disminuir la liberación basal de DA en el NAc (Lategan *et al*, 1990). Parece que las interacciones entre la NE y DA juegan un papel relevante en la farmacología de los psicoestimulantes. Por ejemplo, la liberación de DA en el NAc y la preferencia de lugar condicionada inducida por amfetamina, son atenuadas por una depleción en NE en el PFC de roedores (Ventura *et al*, 2003). Lesiones del locus coeruleus o inactivación de los receptores adrenérgicos $\alpha 1$ pueden también atenuar la locomoción y sensibilización, inducida tanto por cocaína como amfetamina, en roedores (Drouin *et al*, 2002a; Drouin *et al*, 2002b; Weinshenker *et al*, 2002). De manera análoga, agonistas de receptores adrenérgicos $\alpha 2$, que bloquean la liberación de NE mediante la activación del autoreceptor, bloquean el *reinstatement* del comportamiento extinguido de SA de cocaína inducido por estrés en roedores (Erb *et al*, 2000). Por el contrario, antagonistas del receptor adrenérgico $\alpha 2$ pueden reestablecer el comportamiento de búsqueda de cocaína en monos (Lee *et al*, 2004).

Estudios más recientes han evidenciado que la inhibición del NET tienen un papel crítico en el *reinstatement* inducido por cocaína (Platt *et al*, 2007). Existe una correlación positiva entre la potencia de liberación de NE inducido por drogas y la dosis de droga que produce efectos subjetivos estimulantes en humanos tras una administración oral (Rothman *et al*, 2001). Estos estudios indican que existen algunas evidencias a cerca de que la NE ejerce un papel en las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes en roedores (Tella, 1995) y primates no humanos (Kleven and Woolverton, 1990; Mello *et al*, 1990; Woolverton, 1987).

1.8.3. Sistema glutamatérgico

La interacción entre el sistema glutamatérgico y dopaminérgico ha sido una de las áreas de más creciente interés en el estudio del abuso a drogas y salud mental. Las interacciones entre ambos sistemas y los sustratos anatómicos donde se producen han sido bien caracterizadas en roedores (Sesack *et al*, 2003). Las aferencias dopaminérgicas desde VTA al estriado dorsal, NAc y PFC modulan la función glutamatérgica. Tanto VTA como el NAc, reciben una importante inervación glutamatérgica desde una gran variedad de regiones cerebrales incluyendo el PFC, hipocampo, amígdala basolateral y tálamo. Evidencias derivadas de estudios en roedores han documentado que el receptor de Glu tiene un papel importante en las acciones farmacológicas de la cocaína y otros psicoestimulantes. En concreto, los sistemas glutamatérgicos se han implicado en el desarrollo de la sensibilización locomotora, la preferencia de lugar condicionada, la SA y *reinstatement* del comportamiento extinguido de SA de drogas (Carlezon *et al*, 2002; Cornish and Kalivas, 2000, 2001; Harris and Aston-Jones, 2003b; Pierce *et al*, 1996). Evidencias recientes indican que los receptores de Glu metabotrópicos (mGluR), tienen una función en los efectos comportamentales de la cocaína asociados con su potencial de abuso. La administración de agonistas mGluR2/3, disminuyen la liberación de Glu y DA en el NAc, estriado y PFC (Battaglia *et al*, 1997; Hu *et al*, 1999; Moghaddam and Adams, 1998; Xi *et al*, 2002a). El principal origen del Glu sináptico parece estar regulado por transportadores de cisteína/Glu (Baker *et al*, 2002; Xi *et al*, 2002a). El cese de un consumo repetido de cocaína en roedores, produce un descenso en los niveles extracelulares de Glu en el NAc debido a reducciones en el intercambio cisteína/Glu (Baker *et al*, 2003; Xi *et al*, 2002b). El reestablecimiento de este intercambio por la administración sistémica de N- acetilcisteína, normaliza los niveles de Glu en ratas tratadas con cocaína y previene el *reinstatement* inducido por la droga. En conjunto, estas evidencias aportadas por estudios en roedores indican la importancia del sistema glutamatérgico en el mantenimiento y *reinstatement* de la conducta de SA (Kalivas *et al*, 2003b; McFarland *et al*, 2003). Otro subtipo de receptor glutamatérgico, mGluR5, se ha visto también relacionado con la SA de cocaína. Ratones que presentan una deficiencia en este receptor no

adquieren la conducta de SA de cocaína y el pretratamiento con antagonistas de este subtipo de receptor, suprimen la SA de la droga en monos (Lee *et al*, 2005)

1.8.4. Sistema GABAérgico

El GABA ejerce un efecto inhibitorio en el sistema nervioso central y modula la liberación basal de DA y Glu (Dewey *et al*, 1992). La región del VTA contiene también interneuronas inhibitorias GABAérgicas que tienen la función de controlar la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas de esta región cerebral (Steffensen *et al*, 1998). La mayor parte de las proyecciones en el NAc son de neuronas GABAérgicas, algunas de las cuales proyectan a VTA y regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Kita and Kitai, 1988). Varios estudios han indicado que los compuestos GABAérgicos pueden modular de manera efectiva los efectos neuroquímicos y comportamentales inducidos por la cocaína (Cousins *et al*, 2002; Roberts and Brebner, 2000). Agonistas alostéricos GABAa, como las benzodiazepinas y barbitúricos, pueden inhibir la actividad de la DA y Glu, pero producen fuerte efectos sedativos e hipnóticos. Sin embargo, existe un considerable interés por agentes GABA_B, como el baclofén debido a su capacidad de atenuar la liberación de DA y Glu (Dewey *et al*, 1997; Dewey *et al*, 1992; Morgan and Dewey, 1998) y suprimir la SA de cocaína, bajo un amplio rango de dosis y programas de refuerzo y condiciones de acceso a la droga (Campbell *et al*, 1999; Cousins *et al*, 2002; Shoaib *et al*, 1998). La inhibición farmacológica de la enzima GABA transaminasa, la enzima encargada de la metabolización del GABA, puede producir un rápido incremento en el nivel extracelular de GABA y una atenuación en la SA de cocaína a dosis que no alteran la actividad locomotora (Dewey *et al*, 1998; Kushner *et al*, 1999). A pesar de que los psicoestimulantes no ejercen sus efectos farmacológicos directos sobre el sistema GABAérgico, hay evidencias convincentes de que este neurotransmisor puede modular algunos los efectos neuroquímicos y comportamentales inducidos por éstos.

2.- MODELOS ANIMALES

2.1. Introducción

Como hemos definido anteriormente, la adicción es un trastorno crónico caracterizado por un consumo compulsivo y pérdida de control de la conducta, a pesar de sus consecuencias negativas (Jaffe, 1990). Uno de los mayores problemas relacionados con la adicción es la recaída, definida como una vuelta a la búsqueda o consumo de drogas tras un periodo de abstinencia. Los adictos generalmente tienen una persistente vulnerabilidad por recaer en el consumo tras días, meses o incluso años de abstinencia, por lo que la prevención de la recaída se considera uno de los aspectos más complejos en el tratamiento de los procesos adictivos (O'Brien, 1997). El tratamiento de la adicción normalmente comienza con evaluaciones médicas y psicosociales y tratando de aliviar los síntomas de abstinencia (detoxificación) que ayudan al paciente a alcanzar un estado libre de droga. Sin embargo, el problema más importante en el tratamiento de la adicción es prevenir la recaída en el consumo de la droga.

A pesar de los grandes avances en el tratamiento de los síntomas producidos por la abstinencia a opiodes, alcohol y nicotina, tratamientos completamente exitosos para el tratamiento de las adicciones son bien inexistentes o bien inadecuados en términos de controlar el deseo de consumir y por tanto la recaída (Nestler, 2002b). Además, las drogas de abuso producen cambios patológicos en el cerebro que pueden persistir durante largos periodos de tiempo, incluso después de haber cesado el consumo (Hyman *et al*, 2001; Kalivas and O'Brien, 2008). Como consecuencia, recientes investigaciones preclínicas se han centrado en identificar estos cambios neuroadaptativos y ambientales mantenidos durante el tiempo y los mecanismos neurobiológicos que subyacen al proceso de recaída. Estos esfuerzos han permitido descubrir nuevas modalidades de tratamiento para prevenir la recaída. Recientes enfoques implican nuevas terapias combinadas con la tradicional psicoterapia y asesoramiento (O'Brien, 2008). Estas nuevas medicaciones pueden ser usadas para disminuir la fuerza de las claves condicionadas que pueden desencadenar la recaída, e incrementar el desarrollo de nuevas memorias relacionadas con recompensas naturales. La prevención y tratamiento con vacunas representa otro enfoque experimental que

está actualmente siendo investigado en ensayos clínicos (Martell *et al*, 2005; Sofuoglu and Kosten, 2006).

2.2. Modelos animales de recaída

La mayor parte de los avances a cerca de los mecanismos que subyacen al proceso de adicción y recaída han sido obtenidos gracias al estudio en modelos animales. Los animales se autoadministran muchas de las drogas consumidas por los humanos y muestran patrones de consumo similares a los observados en pacientes adictos (Caine and Koob, 1993; Deroche-Gamonet *et al*, 2004). A pesar de que los modelos animales no simulan completamente la adicción en humanos, un gran número de laboratorios han desarrollado y aplicado con éxito el modelo animal de *reinstatement* con la finalidad de estudiar diferentes factores relacionados con el proceso de recaída. Según la literatura, el *reinstatement* hace referencia a la reanudación de una respuesta previamente aprendida (por ejemplo el comportamiento de presionar una palanca), que se produce cuando el sujeto es expuesto de manera no contingente a un estímulo incondicionado (por ejemplo comida o droga) después de un periodo de extinción (Bouton and Swartzentruber, 1991). Tanto en humanos como en estudios con animales de experimentación, se ha demostrado que el deseo por consumir (*craving*) y la recaída, tras periodos prolongados de abstinencia, se desencadenan por la exposición a: 1) pequeñas dosis de droga (*priming*), 2) claves previamente asociadas con el consumo de la droga y 3) por una situación estresante. De acuerdo con esto, estudios en laboratorios han mostrado que un *priming* de heroína, cocaína, alcohol o nicotina incrementa el *craving* en consumidores de las respectivas drogas (Jaffe *et al*, 1989). Episodios estresantes y la exposición a claves o contextos asociados con el consumo de drogas desencadenan en humanos los comportamientos que conducen a la recaída (Foltin and Haney, 2000; Shiffman, 1982; Sinha *et al*, 2006). Dos modelos animales de *reinstatement* han sido desarrollados para modelar el proceso de búsqueda de droga y recaída en el consumo: 1) Preferencia de lugar condicionada (CPP) basada en el condicionamiento Pavloviano y 2) Autoadministración (SA) basada en el condicionamiento operante y Pavloviano.

2.2.1. Preferencia de lugar condicionada

Varios laboratorios han desarrollado procedimientos de *reinstatement* utilizando el modelo de CPP tanto en ratas como ratones. Este paradigma se basa en el condicionamiento clásico, a diferencia de la SA que principalmente se basa en el condicionamiento instrumental y supuestamente modela el comportamiento de búsqueda de droga inducido por estímulos contextuales. En este procedimiento uno de los compartimentos es repetidamente apareado con inyecciones de droga, mientras que un compartimento diferente es apareado con inyecciones de salino.

Tras el entrenamiento, los sujetos son sometidos a un test en el que tienen que elegir libremente entre los dos compartimentos (Figura 5). Cuanto mayor es el efecto recompensante de la droga, más tiempo pasarán los animales en el compartimento apareado. Durante la fase de extinción, la preferencia por el compartimento es gradualmente disminuida. La extinción puede conseguirse mediante la administración de inyecciones de salino en ambos compartimentos o bien permitiendo a los animales explorar libremente los dos espacios durante sesiones diarias en ausencia de droga. Una vez alcanzada la extinción, el *reinstatement* de la preferencia de lugar condicionada puede inducirse por la exposición a drogas o estresores (Lu *et al*, 2000; Mueller and Stewart, 2000; Wang *et al*, 2000). La ventaja del *reinstatement* utilizando el paradigma del CPP, es la ausencia de efectos motores no específicos producidos por las manipulaciones farmacológicas que pueden influenciar el comportamiento, ya que la medida dependiente no está basada en una respuesta operante. Asimismo es un modelo metodológicamente sencillo, que puede realizarse rápidamente (algunas veces con un solo apareamiento de la droga y el contexto) y es sensible a dosis relativamente bajas de droga (Tzschentke, 2007). No obstante, varios factores pueden limitar la relevancia de este modelo al intentar extrapolarlo al consumo crónico y compulsivo observado en individuos adictos. En primer lugar, el CPP no evalúa los efectos reforzantes principales de las drogas ni la conducta relacionada con el consumo, ya que no existe un consumo contingente de la droga en este modelo. En relación con este problema encontramos también la incapacidad de determinar los cambios dinámicos producidos en los animales a lo largo del tiempo de consumo. En segundo lugar, la administración no contingente de droga en el modelo de CPP tiene una serie de propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas diferentes a

las producidas tras una administración contingente y repetida en humanos dependientes. Es importante mencionar que la exposición total a la droga siguiendo este modelo experimental es relativamente baja. Finalmente, algunos de los efectos del CPP pueden reflejar algún tipo aprendizaje dependiente del estado en el que se encuentra el animal (bajo el efecto de la droga o de salino), en lugar de deberse a su eficacia reforzante.

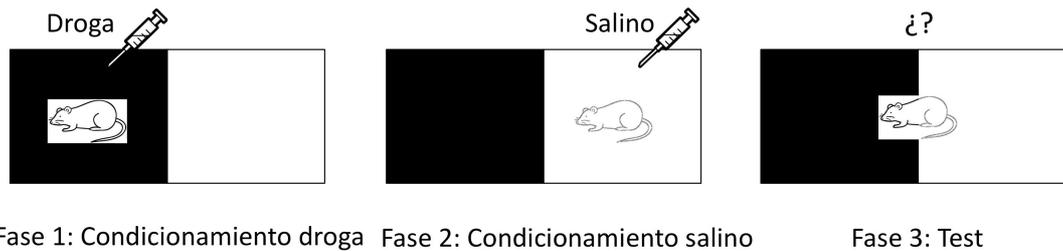


Figura 5. Modelo de preferencia de lugar condicionada empleado. El animal es condicionado bajo los efectos de la droga a uno de los compartimentos y bajo salino al otro durante varias sesiones/días que se realizan de forma alterna. El día del test, el animal libre de droga, tiene acceso a ambos compartimentos y la preferencia mostrada por cada uno de ellos es cuantificada. Cuanto mayor sea esta preferencia mayor se supone es el efecto recompensante de la droga.

2.2.2. Autoadministración

El método más frecuentemente empleado para el estudio de la recaída es el modelo de extinción-*reinstatement* después de la autoadministración intravenosa de droga. La autoadministración modela el comportamiento de consumo en humanos y evalúa las propiedades recompensantes de las drogas. El *reinstatement* de la conducta de búsqueda tras la extinción implica la restauración de una respuesta operante concreta. En este modelo, un catéter es implantado quirúrgicamente en una vena principal, aunque también hay modelos de autoadministración en los que otras drogas como el alcohol pueden ser administradas oralmente. La autoadministración de drogas, ya sea mediante la presión de una palanca o mediante el contacto de la nariz sobre una pantalla táctil, se realiza hasta que los animales adquieren un nivel estable de respuestas. Una vez alcanzado, la conducta es extinguida eliminando la droga reforzante, bien

sustituyéndola por salino o simplemente desconectando la bomba de infusión. Cuando se ha llegado al criterio de extinción establecido por los experimentadores (por ejemplo, una diferencia del 20% o menor en el número de respuestas producidas entre la última sesión de extinción y la primera), la capacidad de una simple exposición, bien a drogas, estrés o claves asociadas, puede producir el *reinstatement* de la conducta operante, proporcionando una medida de búsqueda de droga. Se considera que se ha producido el *reinstatement* si el animal incrementa la tasa de respuestas por encima de las producidas durante la extinción y muestra además selectividad en la tarea (Figura 6).

El *reinstatement* de la búsqueda de droga ha sido estudiado utilizando diferentes variaciones del modelo de *reinstatement* (Shalev et al, 2002); entre-sesión, intra-sesión o entre-intra-sesión. En el paradigma entre-sesión, el más comúnmente utilizado, la fase de SA, extinción y *reinstatement* son realizados en sesiones diarias secuenciales. En el paradigma intra-sesión, el entrenamiento de SA (1-2 horas), la extinción (3-4 horas) y el *reinstatement*, se realizan el mismo día. En el paradigma entre-intra-sesión, la fase de SA tiene lugar en varios días, mientras que la extinción y *reinstatement* se realizan en el mismo, tras varios días de abstinencia (Shaham et al, 2003).

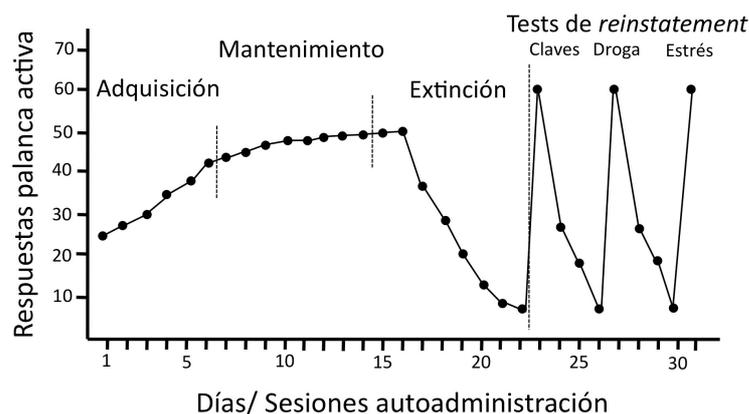


Figura 6. Paradigma experimental del *reinstatement* del comportamiento de búsqueda de droga mostrando respuestas sobre la palanca activa en fases representativas de la SA de drogas (adquisición y mantenimiento), extinción y tests de reinstatement inducidos por claves, drogas y estrés. Figura modificada de Noushin Yahyavi-Firouz-Abadi, Ronald E. See (2009).

Existen modelos de recaída modificados en los que los animales son sometidos a una abstinencia forzada en la misma caja donde son estabulados o en un ambiente alternativo neutro, sin pasar por la fase de extinción (Fuchs *et al*, 2006). Este modelo de abstinencia puede tener una mayor relevancia en humanos, ya que los adictos raramente experimentan periodos de extinción diarios relacionados con claves y contextos asociados con las drogas durante la abstinencia.

2.3. Factores que desencadenan la recaída

2.3.1. Recaída inducida por drogas

La administración de un *priming* ha servido desde hace tiempo como un potente estímulo para desencadenar el comportamiento extinguido de búsqueda de drogas (de Wit and Stewart, 1981; Gerber and Stretch, 1975). Un *priming* puede inducir recaída tanto administrado de forma sistémica como directamente en regiones cerebrales específicas, fundamentalmente en VTA y NAc (Stewart, 1984; Stewart and Vezina, 1988). Varios sistemas neurotransmisores están implicados en la regulación de la recaída inducida por drogas, incluyendo la DA, Glu, opioides endógenos, GABA y endocannabinoides. Sin embargo, evidencias recientes han revelado la convergencia de todos estos sistemas en un sustrato glutamatérgico corticoestriatal (Kalivas *et al*, 2005). El *reinstatement* inducido por *priming* implica a las proyecciones glutamatérgicas que parten del PFC dorsomedial (dmPFC) hacia regiones del NAc *core* e inervaciones dopaminérgicas del dmPFC (McFarland and Kalivas, 2001). Numerosas evidencias han mostrado un papel crítico de la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en la recaída inducida por *priming* para diferentes drogas de abuso, incluyendo cocaína y heroína (Knackstedt and Kalivas, 2009).

2.3.2. Recaída inducida por estrés

En humanos, eventos estresantes pueden disparar los comportamientos de búsqueda y consumo de drogas (Shiffman, 1982; Shiffman *et al*, 1996; Sinha *et al*, 1999). De la misma manera, el *reinstatement* inducido por estrés en animales de

laboratorio se ha utilizado como modelo para estudiar la recaída en humanos (Erb *et al*, 1996; Koob and Le Moal, 2001; Shaham *et al*, 2000a)(Erb *et al*., 1996; Shaham *et al*., 2000a; Koob & Le Moal, 2001). El estrés puede inducir una variedad de factores precipitantes, aunque en modelos animales, descargas intermitentes (*footshocks*) o estrés inducido farmacológicamente (Erb *et al*, 1996; Feltenstein and See, 2006; McFarland *et al*, 2004; Piazza and Le Moal, 1998), han sido los dos métodos estresores más efectivos para inducir el *reinstatement*. Los neurocircuitos implicados en este tipo de recaída incluyen al núcleo noradrenérgico tegmental lateral (Shaham *et al*, 2000b) y sus proyecciones noradrenérgicas a través del haz noradrenérgico ventral (Moore and Bloom, 1979) al núcleo central de la amígdala, núcleo del lecho de la estría terminal, hipotálamo, septum medial y NAc (Shaham *et al*, 2003). Al igual que en el *reinstatement* inducido por *priming*, en el *reinstatement* inducido por estrés, todas estas estructuras implicadas convergen en una vía glutamatérgica corticoestriatal común (McFarland *et al*, 2004).

2.3.3. Recaída inducida por claves

Uno de los principales factores que desencadenan e *reinstatement* es la reexposición a estímulos sensoriales previamente asociados con el consumo de drogas. Este tipo de *reinstatement* utilizado en modelos animales, es una potente herramienta para emular la recaída en humanos (See, 2002). Diferentes tipos de estímulos pueden inducir la búsqueda de drogas, incluyendo estímulos discretos, discriminativos y contextuales. En estudios de *reinstatement* inducido con estímulos discretos, cada infusión de droga es apareada con la presentación de un estímulo, como por ejemplo una luz o un sonido. La conducta operante es después extinguida en ausencia de estos estímulos discretos y reestablecida mediante la reexposición a ellos. El estímulo asociado a la droga puede ser presentado como un refuerzo condicionado y/o como un estímulo discriminativo. En el procedimiento inducido por estímulos discriminativos, los animales son entrenados a autoadministrarse droga o salino en presencia de diferentes tipos de estímulos, indicando unos la disponibilidad de droga (S+) y otros la disponibilidad de salino (S-). La extinción de la respuesta, producida en ausencia de estímulos discriminativos, puede ser restaurada únicamente por la exposición al estímulo

que indicaba la disponibilidad de droga (Weiss *et al*, 2000). En el *reinstatement* inducido por contexto, los sujetos aprenden primero a autoadministrarse la droga en un determinado contexto y presencia de diferentes estímulos ambientales que indican la disponibilidad de droga. El comportamiento en este caso es extinguido por la exposición a un contexto diferente, con características táctiles, visuales, auditivas y olfatorias diferentes al contexto en el que el animal recibe la droga. La reexposición al contexto asociado con el consumo reactiva la búsqueda de droga (Crombag *et al*, 2002; Fuchs *et al*, 2005).

Proyecciones glutamatérgicas y dopaminérgicas del VTA, amígdala basolateral (BLA), dmPFC y NAc *core*, parecen ser las principales vías que median el *reinstatement* inducido por claves, aunque un gran número de sistemas neurotransmisores está también implicado (Feltenstein and See, 2008). Determinar el circuito neural que subyace al proceso de *reinstatement* inducido por diversos estímulos puede ayudar a elucidar las bases neurobiológicas del *craving* que experimentan los adictos cuando son expuestos a la parafernalia asociada previamente al consumo, como jeringuillas, agujas, pipas de fumar, o al contexto en el que consumieron la droga. La identificación de este circuito puede ayudar también en el desarrollo de nuevas medicaciones con un potencial *anti-craving* (O'Brien and Gardner, 2005).

Aunque las vías implicadas en los tres tipos de *reinstatement* son diferentes en muchos aspectos, las evidencias recopiladas recientemente indican que las proyecciones desde VTA (común en todas las formas de *reinstatement*), regiones de la BLA (*reinstatement* inducido por claves), y de la amígdala central, núcleo del lecho de la estría terminal y NAc *shell* (*reinstatement* por estrés), convergen en circuitos motores implicando proyecciones glutamatérgicas desde el dmPFC al NAc *core*, las cuales representan una vía final común para los tres tipos de factores que desencadenan la recaída (Feltenstein *et al*, 2008; Kalivas and McFarland, 2003a; Shaham *et al*, 2003). Además, un incremento de Glu en las sinapsis desde las terminales de las neuronas del PFC inducido por los tres tipos de factores desencadenantes, provoca el *reinstatement* de búsqueda de droga (Knackstedt *et al*, 2009), por lo que la modulación farmacológica de los sustratos que controlan estos circuitos pueden dar lugar a modalidades terapéuticas eficaces.

2.4. Validez del modelo de *reinstatement* de recaída

El mayor reto en la interpretación de los resultados obtenidos de estudios preclínicos es poder extrapolarlos a humanos. Un gran número de investigadores han estudiado la validez del método de *reinstatement* de recaída (Epstein and Preston, 2003; Epstein *et al*, 2006; Katz and Higgins, 2003a). Numerosos estudios han mostrado considerables similitudes en los factores que provocan la recaída, drogas, estrés y claves asociadas, entre animales y humanos (Epstein *et al*, 2006), indicando un nivel razonable de validez predictiva a los modelos animales. Sin embargo, la capacidad de que un modelo animal marque el desarrollo de nuevos tratamientos para tratar la adicción en humanos, particularmente la adicción a los psicoestimulantes, sigue siendo controvertida (Katz *et al*, 2003a; McKay *et al*, 2006; O'Brien *et al*, 2005). La mayor limitación es la inexistencia de estudios clínicos que sean completamente equivalentes a los diseñados en modelos animales. Por ejemplo, el diseño en modelos animales de un historial de abstinencia y especialmente un entrenamiento de extinción, raramente existe en humanos dependientes enrolados en estudios clínicos (Conklin and Tiffany, 2002). En parte esto se debe a que la abstinencia requiere la hospitalización y la extinción generalmente es inefectiva en pacientes adictos (Conklin *et al*, 2002), aunque este aspecto permanece aún por determinar. Además, la medida de los resultados generalmente difiere entre ensayos clínicos, en los que se miden cambios en el consumo o efectos subjetivos de las drogas, y ensayos preclínicos, donde se analiza la recaída en la búsqueda de la droga (Epstein *et al*, 2003). A ello se suma el hecho de que otros factores relacionados con la naturaleza multifactorial de la recaída obtenidos de estudios animales deban ser considerados en modelos clínicos (Epstein *et al*, 2003). Por ejemplo, el bloqueo del *reinstatement* de búsqueda de alcohol inducido por estrés en ratas tratadas con fluoxetina (Le *et al*, 1999), no resulta necesariamente en una prevención de la recaída en humanos alcohólicos inducida por otros factores (Kranzler *et al*, 1995). Sumado al limitado paralelismo entre los diseños preclínicos y clínicos, hay que añadir que muchas de las medicaciones testadas en modelos animales de *reinstatement* no han sido todavía testadas en ensayos clínicos.

Además de que el modelo animal sea predictivo de lo que puede suceder en ensayos clínicos, es importante descubrir tratamientos apropiados que posean los

mecanismos de acción deseados (Epstein *et al*, 2003). A pesar de la homología en la neuroanatomía implicada en el *reinstatement* de búsqueda de drogas en ratas (Feltenstein *et al*, 2008) y el *craving* en estudios con humanos como ha sido determinado en estudios de imagen *in vivo* (Volkow *et al*, 2004), es necesario mucho más trabajo para poder establecer la validez del modelo de recaída, como ya existen para otros trastornos neuropsiquiátricos (Willner, 1984).

Para los clínicos, la identificación de farmacoterapias efectivas con limitados efectos secundarios y bajo potencial de abuso constituye una de las mayores prioridades en la transición de estudios preclínicos a estudios clínicos. Desafortunadamente, varias medicaciones que han mostrado ser efectivas en estudios con animales no han mostrado esta eficacia en estudios clínicos, sugiriendo que los modelos animales proporcionan un gran número de falsos positivos. Como se ha indicado anteriormente, esta falta de concordancia puede deberse a la insuficiencia de datos clínicos relevantes. Los ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes adictos, incluyendo estudios de extinción o abstinencia, son escasos y difíciles de realizar y en los pocos que se han realizado las medicaciones testadas no han sido analizadas en modelos animales. Por lo tanto, a pesar de que todavía hay muchos aspectos por esclarecer, parece prematuro rechazar el modelo de *reinstatement* por la generación de falsos positivos.

Sorprendentemente, los resultados más prometedores obtenidos del uso transnacional de modelos animales se han obtenido en estudios de la dependencia a heroína usando naltrexona, metadona y buprenorfina (Comer *et al*, 2006; Leri *et al*, 2004; Sorge *et al*, 2005). Similares resultados se han observado para dos potentes tratamientos contra la dependencia a nicotina. Uno de ellos es un antagonista del receptor cannabinoide CB1 (Fagerstrom and Balfour, 2006) y el otro la vareniclina, un agonista parcial del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$ (Spiller *et al*, 2009). Podría decirse que el resultado más satisfactorio del enfoque translacional ha sido alcanzado en el tratamiento de la dependencia al alcohol, donde se ha observado que la naltrexona bloquea la recaída tanto en ratas como en humanos con un historial crónico de consumo (Latt *et al*, 2002; Le *et al*, 1999; Streeton and Whelan, 2001; Volpicelli, 1995). El uso clínico de acamprosato (Sass *et al*, 1996; Tempesta *et al*, 2000), fármaco indicado en la terapia de mantenimiento de la

abstinencia después de un periodo de desintoxicación, se basó también en evidencias obtenidas en modelos animales (Holter *et al*, 1997; Spanagel *et al*, 1996), sin embargo su eficacia no ha sido corroborada en estudios clínicos recientes (Anton *et al*, 2006). Con respecto a los psicoestimulantes, el modelo de *reinstatement* no ha identificado a día de hoy ninguna medicación claramente eficaz para la prevención de la recaída, aunque como se discutirá más adelante. Un gran número de ensayos clínicos han evaluado el potencial terapéutico de diferentes fármacos en la dependencia a la cocaína y encontrado resultados alentadores en la reducción del consumo, alivio de los síntomas producidos por la retirada de la droga y prolongación del tiempo de abstinencia.

3.- TERAPÉUTICA.

3.1. Medicaciones testadas para el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes en humanos

Actualmente, no hay medicaciones aprobadas por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes. Varios estudios clínicos han sido llevados a cabo con posibles medicaciones que pueden ser eficaces para tratar la adicción a la cocaína o metanfetamina (Tabla 1). Estudios en animales han mostrado de forma repetida que un incremento en la actividad GABA reduce la SA de cocaína (Filip *et al*, 2007; Peng *et al*, 2009). Estudios preliminares en ensayos clínicos empleando baclofén, un agonista del receptor GABA_B, y topiramato, el cual activa receptores GABA_A, han mostrado éxito en la reducción del consumo de cocaína en humanos (Shoptaw *et al*, 2003). Además, un estudio clínico realizado en laboratorio mostró que el baclofén reducía la SA de cocaína en pacientes no dependientes a opioides (Haney *et al*, 2006), aunque no ayudó en las primeras fases de la abstinencia en individuos con una fuerte dependencia por la cocaína (Kahn *et al*, 2009). El topiramato redujo el consumo e incrementó los resultados negativos realizados en tests de orina (Johnson, 2005; Kampman *et al*, 2004). La vigabatrina, un inhibidor de la GABA transaminasa, mostró efectos prometedores en tres estudios clínicos realizados con pacientes dependientes de cocaína y/o metanfetamina (Brodie *et al*, 2003; Brodie *et al*, 2005; Fechtner *et al*, 2006). Se han llevado a cabo estudios clínicos controlados para evaluar más profundamente los efectos de este fármaco (Brodie *et al*, 2005). A pesar de que la facilitación de la actividad GABA parece reducir el consumo de cocaína, es interesante hacer notar que la tiagabina, que bloquea la liberación presináptica de GABA, también disminuyó el consumo de cocaína e incrementó el tiempo de abstinencia en dos ensayos clínicos controlados (Gonzalez *et al*, 2007; Gonzalez *et al*, 2003).

	FÁRMACO	MODO DE ACCIÓN	RESULTADOS	ESTUDIOS
AGENTES GABA	TOPIRAMATO	ACTIVA RECEPTORES GABA _a	DISMINUYE CONSUMO	Shoptaw, 2003 Johnson, 2005, Kampman, 2004
	BACLOFEN	AGONISTA GABA _b	DISMINUYE CONSUMO	Haney, 2006 Shoptaw, 2003 Kahn, 2009
	VIGABATRINA	INHIBIDOR DE LA GABA TRANSAMINASA	INCREMENTA TIEMPO ABSTINENCIA	Brodie, 2003 Brodie, 2005 Fechtner, 2006
	TIAGABINA	BLOQUEA LIBERACIÓN GABA	DISMINUYE CONSUMO INCREMENTA TIEMPO ABSTINENCIA	Gonzalez, 2003 Gonzalez, 2007
AGENTES DA	BUPROPIÓN	INHIBIDOR CAPTURA DA	NO MODIFICA LA RESPUESTA SUBJETIVA DE LA COCAÍNA	Margolin, 1995 Poling, 2006
	LEVODOPA/ CARVIDOPA	PRECURSOR DA	NO DISMINUYE CONSUMO	Shoptaw, 2005 Mooney, 2007
ANTIPIPSICÓTICOS	RISPERIDONA/ OLANZAPINA		DISMINUYEN <i>CRAVING</i> NO REDUCEN CONSUMO	Smelson, 2004 Smelson, 2006 Kampman, 2003 Grabowski, 2004
	ARIPIRAZOLE	AGONISTA PARCIAL DA y 5HT	DISMINUYE EL CRAVING	Beresford, 2005 Vorspan, 2008
MEDICACIONES DE REEMPLAZO	METILFENIDATO	BLOQUEA CAPTURA CATECOLAMINAS	DISMINUYE CONSUMO	Levin, 2007
	DISULFIRÁN	INCREMENTA NIVELES DA	DISMINUYE CONSUMO	Carroll, 1998 George, 2000 Carroll, 2004
	MODAFINIL	INCREMENTA NIVELES GLU	DISMINUYE CONSUMO	Dackis, 2005 Hart, 2008
	DEXTROANFETAMINA		DISMINUYE CONSUMO	Shearer, 2003 Grabowski, 2004
	COCAÍNA ORAL		DISMINUYE RESPUESTAS FISIOLÓGICAS	Walsh, 2000
ANTIDEPRESIVOS	DESIPRAMINA/ FLUOXETINA/ IMIPRAMINA		DISMINUYEN EL CRAVING INCREMENTAN TIEMPO ABSTINENCIA	Kosten, 2003 Oliveto, 1999 Schmitz, 2001

Tabla 1. Estudios clínicos controlados llevados a cabo con medicaciones prometedoras para el tratamiento de la adicción a cocaína

Estudios recientes han evaluado varios agentes dopaminérgicos en el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes. El bupropión, un inhibidor no selectivo de la captura de DA, mostró efectos variables en dos estudios controlados con pacientes dependientes de cocaína y opioides (Poling *et al*, 2006). La administración combinada de levodopa-carvidopa, precursor de la DA, no redujo el consumo de cocaína o el *craving* en tres ensayos clínicos realizados (Mooney *et al*,

2007) pero mostró efectos prometedores cuando se combinó con terapia comportamental (Schmitz *et al*, 2008). Varios investigadores han evaluado también los efectos sobre el consumo de cocaína y el *craving* de una segunda generación de fármacos antipsicóticos. Entre ellos, la risperidona y olanzapina han mostrado disminuir la euforia asociada al consumo de cocaína o el *craving* desencadenado por la presentación de estímulos condicionados, en estudios de laboratorio (Smelson *et al*, 2004; Smelson *et al*, 2006). Sin embargo, estos fármacos no redujeron el consumo (Grabowski *et al*, 2004; Kampman *et al*, 2003; Reid *et al*, 2005). El aripiprazole, otro un fármaco antipsicótico que actúa como agonista parcial de receptores de DA y 5-HT, administrado de forma aguda, bloqueó el *reinstatement* de búsqueda de droga inducido por cocaína y estímulos condicionados en ratas (Feltenstein *et al*, 2007). Además ha mostrado tener efectos positivos al reducir el *craving* (Beresford *et al*, 2005)(Beresford *et al*, 2005; Vorspan *et al*, 2008) y se está continuando actualmente con su estudio para determinar su efectividad. Los agonistas de receptores de la familia D1, atenúan tanto el *reinstatement* inducido por cocaína como por estímulos condicionados en modelos animales (Self *et al*, 2000; Spealman *et al*, 1999). Uno de estos agonistas, DAS-431, se encuentra bajo investigación en pacientes dependientes de cocaína (Heidbreder and Hagan, 2005).

Otro enfoque importante para tratar la adicción a los psicoestimulantes ha sido la evaluación de medicaciones con propiedades farmacológicas similares a las de las mismas drogas de abuso, con la finalidad de eliminar los síntomas de la abstinencia y reducir la incidencia de recaídas. Un ejemplo de este enfoque terapéutico es lo que se ha denominado terapia agonista de reemplazo. El metilfenidato es una medicación aprobada para el tratamiento del déficit de atención y trastorno de hiperactividad (ADHD), que bloquea la captura de catecolaminas. Ha mostrado algunos efectos beneficiosos en la reducción del consumo de cocaína solo en pacientes dependientes de la droga que además padecían de ADHD (Levin *et al*, 2007). El disulfirán, un inhibidor del metabolismo de DA, ha mostrado reducir el consumo de cocaína en adictos con o sin dependencia del alcohol u opiáceos (Carroll *et al*, 2004; Carroll *et al*, 1998; George *et al*, 2000; Petrakis *et al*, 2000). Sin embargo, el disulfirán incrementa la actividad cardiovascular y por lo tanto produce efectos secundarios si se combina con

cocaína, aunque el riesgo es menor que el previamente estimado (Malcolm *et al*, 2008). Otro enfoque reciente como posible tratamiento es el uso del modafinil, un fármaco que posee actividad estimulante y un perfil farmacodinámico complejo que implica a la actividad glutamatérgica (Dackis *et al*, 2005). Se ha demostrado que el modafinil reduce el consumo de cocaína al compararlo con placebo (Dackis *et al*, 2005) aunque un estudio clínico controlado reveló que este efecto era solo significativo en pacientes no dependientes de alcohol (Anderson *et al*, 2009). Otros estudios de laboratorio realizados en humanos han encontrado resultados positivos con este fármaco. Por un lado, uno de ellos demostró que el pretratamiento con modafinil disminuyó la discriminación de cocaína en humanos (Malcolm *et al*, 2006). En otro, el tratamiento con modafinil redujo la SA de cocaína en pacientes dependientes (Hart *et al*, 2008). Otra sustancia en estudio es la dextroanfetamina. Se ha comprobado que ésta también reduce el consumo de cocaína en sujetos dependientes de esta droga o heroína (Grabowski *et al*, 2004; Shearer *et al*, 2003). Por último, formulaciones orales de cocaína también han mostrado atenuar las respuestas subjetivas y fisiológicas de la cocaína (Walsh *et al*, 2000).

Muchos de los compuestos que han sido estudiados han sido testados en pacientes con dependencia tanto de la cocaína como de opiáceos. El agonista parcial para receptores de opioides endógenos, la buprenorfina, ha mostrado reducir la SA de cocaína en primates (Mello and Negus, 2007) y disminuir el consumo de opiáceos y cocaína en individuos dependientes de estas sustancias (Montoya *et al*, 2004). Otro ejemplo es la desipramina, un antidepresivo que reduce el consumo de opiáceos y cocaína en sujetos dependientes que se encuentran bajo tratamiento con buprenorfina (Kosten *et al*, 2003).

Un enfoque diferente ha sido el desarrollo de vacunas que se unen a las moléculas de cocaína, metanfetamina, nicotina, fenilciclina o morfina (Orson *et al*, 2008). Las vacunas actúan produciendo anticuerpos que se unen a las moléculas de droga, bloqueando o reduciendo la entrada al sistema nervioso central. Estudios en animales de experimentación han revelado que las vacunas pueden producir un número adecuado de anticuerpos e inhibir tanto el *reinstatement* como la actividad locomotora inducida por la reexposición a la droga (Carrera *et al*, 2000; Norman *et al*, 2009). En estudios realizados en humanos, la vacuna TA-CD, redujo

significativamente los efectos de la cocaína durante la realización de los ensayos clínicos y disminuyó el consumo en pacientes sometidos a programas de tratamiento, a la vez que mostraba una buena inmunogenicidad, seguridad y eficacia (Orson *et al*, 2008).

En resumen, aunque ninguno de los fármacos utilizados para el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes ha sido aprobado, algunos de ellos, como el modafinil o el bupropión, han mostrado resultados bastante prometedores en estudios clínicos controlados. Algunos tienen la capacidad de reducir los síntomas de abstinencia y reducir el efecto reforzante de la cocaína, por lo que parecen buenos candidatos para ser utilizados durante las primeras fases de la abstinencia. Otras sustancias, principalmente los agentes que incrementan la actividad GABA como el topiramato o la vigabatrina, pueden reducir el *craving* y la capacidad reforzante de la cocaína, por lo que podrían ser más efectivos en la prevención de la recaída. Debido al limitado número de estudios realizados con estos compuestos, y a la presencia de efectos no deseados por parte de algunos de ellos, la continuación con esta línea de investigación es necesaria con la finalidad de identificar a los mejores candidatos que puedan ser utilizados como tratamiento.

3.2. Medicaciones anti-recaída testadas en modelos animales

En los últimos años, gran cantidad de investigaciones se han centrado en el estudio de los efectos sobre el *reinstatement* de diferentes sustancias utilizando el modelo de autoadministración y recaída. Una de las líneas de investigación ha sido la determinación de los neurocircuitos que subyacen a los diferentes tipos de *reinstatement* inducidos por drogas, estrés o estímulos condicionados. Estos estudios se han focalizado en los efectos directos de intervenciones farmacológicas en regiones específicas del cerebro, sobre el consumo o búsqueda de drogas. Otros estudios han adoptado enfoques para filtrar potenciales medicaciones que puedan bloquear la adquisición, el mantenimiento o el *reinstatement* en el consumo y búsqueda de droga. Dado que se ha considerado la recaída como uno de los aspectos más complejos y críticos del proceso adictivo, la investigación sobre el desarrollo de medicaciones que puedan prevenirla es uno de los campos de estudio más importantes. Actualmente, la mayor parte de los estudios en modelos

animales se han centrado en la SA de cocina y la recaída. Aunque algunos de estos estudios de han llevado a cabo en primates, la mayor parte de los resultados obtenidos provienen de estudios con ratas.

Hay que tener también en cuenta que muchos de los estudios existentes que emplearon medicaciones anti-recaída evaluaron los efectos agudos del fármaco sobre las diferentes formas de *reinstatement*. Sólo en un pequeño número de ensayos se han administrado las sustancias de forma repetida durante el periodo de SA de cocaína o antes del *reinstatement*. La administración crónica proporciona un enfoque mucho más comparable al régimen de consumo en humanos. En algunos experimentos, las sustancias fueron crónicamente administradas antes de cada sesión de SA y de forma aguda en los tests de *reinstatement*, obteniendo diferentes resultados. Por ejemplo, la administración aguda de acamprosato bloqueo el *reinstatement* inducido por cocaína y estímulos condicionados, sin embargo la administración crónica previa a cada sesión de SA no ejerció ningún efecto en el consumo de cocaína (Bowers *et al*, 2007). En otro estudio, agonistas de adenosina indujeron efectos inhibitorios sobre el consumo durante las sesiones de SA, pero facilitaron el *reinstatement* de búsqueda de droga (Knapp *et al*, 2001). Estos resultados parecen estar relacionados con las diferencias en los neurocircuitos que controlan los procesos de SA, extinción y *reinstatement*. Estudios recientes han evaluado la administración repetida de fármacos antes de inducir el *reinstatement*. En un estudio, la administración subcrónica del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 durante la abstinencia, incrementó el *reinstatement* de la búsqueda inducido por contexto y estímulos condicionados, cuando fue administrado a dosis altas pero no tuvo efecto a dosis bajas (Gonzalez-Cuevas *et al*, 2007). El tratamiento crónico con fluoxetina durante la abstinencia, atenuó el *reinstatement* inducido por estímulos condicionados pero no por cocaína (Baker *et al*, 2001). Ratas bajo un tratamiento crónico de metadona o buprenorfina (Leri *et al*, 2004; Sorge *et al*, 2005), mostraron una reducción en el *reinstatement* de búsqueda de droga inducido tanto por heroína como por cocaína. Por último, la administración crónica de N-acetilcisteína durante las sesiones diarias de extinción de la conducta de SA, condujo a una inhibición duradera del *reinstatement* inducido por estímulos condicionados y heroína (Zhou and Kalivas, 2008). Todos estos resultados, aunque prometedores, mantienen la puerta abierta a futuras

investigaciones que desarrollen y testen medicaciones que prevengan la recaída inducida por diferentes factores.

4.- ANÁLOGOS DE LA BENZTROPINA

4.1. Introducción

Un significativo número de estudios han apoyado la hipótesis propuesta en primer lugar por Ritz y colaboradores (Ritz *et al*, 1987), en la que se estableció para una gran variedad de inhibidores de la captura de monoaminas, una correlación positiva entre la afinidad por el DAT y la eficacia reforzante. Esta correlación fue mayor que las correlaciones obtenidas considerando las afinidades por el NET y el SERT. El DAT se ha considerado una diana biológica relevante para entender los efectos inducidos por la cocaína y a su potencial de abuso, convirtiéndose por tanto en uno de los principales sustratos sobre el que pudieran actuar medicaciones que traten los síntomas de la adicción a los psicoestimulantes.

Conforme la investigación ha ido avanzando, se han ido poniendo de manifiesto varias limitaciones a la hipótesis del DAT como único mecanismo para producir los efectos de la cocaína. Por ejemplo, estudios con ratones que carecen de DAT muestran preferencia de lugar condicionada y son capaces de autoadministrarse cocaína (Rocha *et al*, 1998; Sora *et al*, 1998). Aunque los mecanismos que subyacen a estos procesos en ratones deficientes en DAT no se conocen completamente, parece claro que los efectos reforzantes de la cocaína, experimentados también en estos animales, no pueden estar mediados exclusivamente por esta diana biológica. Otra limitación a esta hipótesis, se puso de manifiesto en estudios que indicaron que la dosis mínima de varios inhibidores de la captura de DA para producir el desplazamiento del compuesto [3H]GBR 12783 del DAT, produjo diferentes niveles de estimulación en los animales, como indicaron estudios de actividad locomotora (Rothman *et al*, 1992). Estos estudios mostraron que existen diferentes inhibidores de la captura de DA que poseen efectos comportamentales diferentes a los exhibidos por la cocaína en modelos animales.

4.2. Análogos de la Benzotropina

Como se muestra en la figura (Figura 7), la molécula de benzotropina (BZT) comparte estructuras químicas con la molécula de cocaína (anillo tropano) y el anillo difenil éter con las fenilpiperacinas. Un compuesto característico de esta última clase de moléculas es el GRB 12909, un inhibidor de la captura de DA seleccionado para ser evaluado clínicamente como medicación para el tratamiento de la dependencia a cocaína. Por tanto, desde una perspectiva estructural, tanto la BZT como sus análogos parecen ser moléculas con interés para ser estudiadas y consideradas como posibles fármacos.

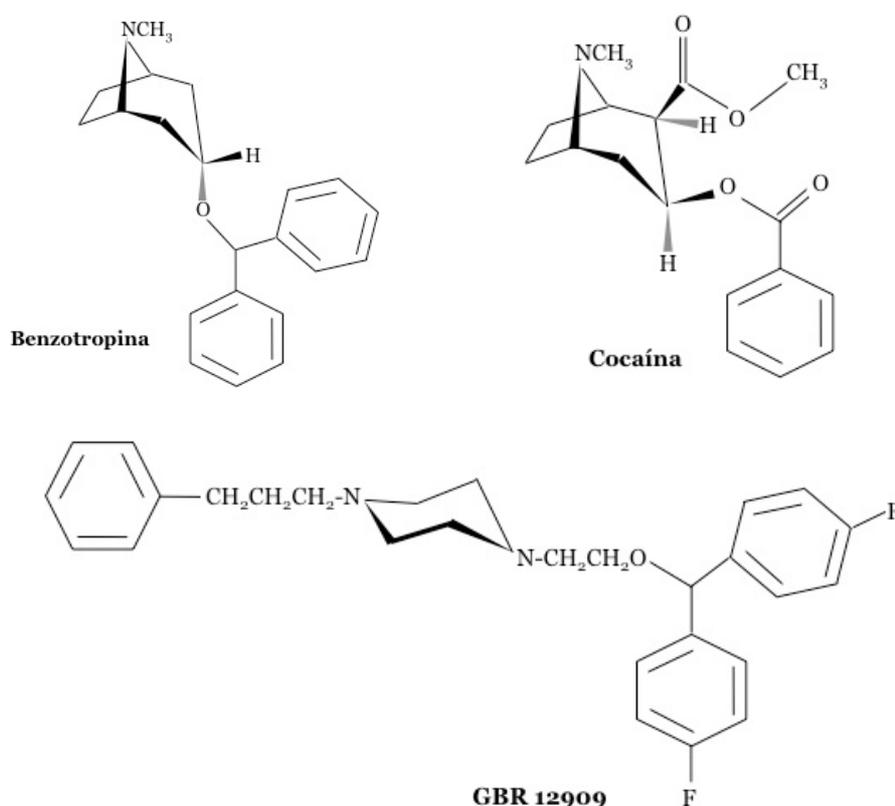


Figura 7. Estructuras químicas de las moléculas de benzotropina, cocaína y GRB 12909.

La molécula de BZT se utiliza actualmente en clínica para tratar los síntomas asociados con la enfermedad de Parkinson. Solo se ha realizado un estudio clínico en el que se ha evaluado el potencial de la BZT como posible medicación para el tratamiento del abuso a cocaína (Penetar *et al*, 2006). En este estudio, se administraron diferentes dosis de BZT (1, 2 y 4 mg/kg) dos horas antes

de que los sujetos, pacientes dependientes de cocaína, tuvieran acceso a autoadministrarse la droga por vía intranasal. Los resultados obtenidos con la BZT fueron comparados con pacientes que recibieron placebo. Diferentes variables fisiológicas y subjetivas fueron medidas durante las dos horas que siguieron a la administración de BZT y continuaron tras la autoadministración de la cocaína. La BZT no modificó ninguna variable cardiovascular ni produjo ningún efecto por sí sola. La cocaína, por el contrario, incrementó las respuestas cardíacas, el *high* y los efectos subjetivos, en los pacientes que fueron tratados con el placebo. La ausencia de efectos secundarios negativos dejan la puerta abierta para el estudio de esta molécula con el fin de evaluar más ampliamente su potencial terapéutico en el campo de la adicción.

En estudios preclínicos llevado a cabo en ratas que habían aprendido a discriminar entre inyecciones de cocaína y salino, se demostró que la BZT no sustituyó completamente por la droga, indicando que los efectos inducidos por ambas sustancias en los animales no son similares (Colpaert *et al*, 1979). Este resultado sugiere que los análogos de esta molécula pueden ser también moléculas de interés, debido a que interactúan de manera diferente con el DAT, comparado con el modo de acción de los inhibidores clásicos de la captura de DA. Estos análogos de la BZT, que mantienen las estructuras comunes tanto con la molécula de cocaína como con la GBR 12909, han mostrado tener, en modelos animales de adicción a los psicoestimulantes, unas propiedades comportamentales que los diferencian de otros inhibidores clásicos, aunque hay que mencionar que no son el único grupo que las muestran. Por ejemplo, un análogo de la cocaína con elevada afinidad por el DAT, el RTI 371, mostró una débil capacidad en inducir actividad locomotora y antagonizó la estimulación producida por la cocaína (Navarro *et al*, 2005). A pesar de que estos análogos no han sido todavía evaluados en ensayos clínicos, los estudios realizados en diferentes paradigmas comportamentales con animales de experimentación, han mostrado resultados bastante prometedores.

4.2.1. Análogos de la BZT con sustitución "-N"

Como se ha comentado con anterioridad, los análogos de la BZT compartían características estructurales comunes con el GBR 12909, pero a diferencia de este compuesto, los análogos muestran una sustitución N-metil en el anillo tropano (Figura 7). En cambio la molécula de GBR 12909 presenta una sustitución propilfenil en el mismo lugar. Esta diferencia parece ser que otorga a los análogos de la BZT la capacidad de poder unirse también a los receptores muscarínicos M1 con afinidad variable. Diferentes grupos alquilo han sido combinados con el grupo N, dando lugar en total a más de 60 análogos que han sido evaluados en ensayos *in vitro*.

En general, los análogos que presentan la sustitución N (N-substitutos) y sustituciones de fluor en los anillos difenil éter, presentan una mayor afinidad por el DAT, que aquellos análogos que presentan otros compuestos halogenados como cloro o bromo. Sin embargo, hay una extensión óptima de estas cadenas alquilo de los N-substitutos, que si es excedida resulta en una menor afinidad por el DAT (Kulkarni *et al*, 2004). A pesar de que la molécula original de BZT presenta una significativa selectividad por el receptor muscarínicos M1 frente al DAT, una notable separación entre estas dos afinidades ha sido conseguida en los análogos, llegando alguno de ellos a tener una afinidad total por el DAT.

4.3. Evidencias *in vivo*

Como se ha explicado, la BZT y sus análogos se unen al DAT con afinidades que están relacionadas con variaciones en su estructura. Muchos de los derivados son selectivos por el DAT en comparación con otros transportadores de monoaminas. Estas acciones deberían, siguiendo con la hipótesis del DAT y las acciones de la cocaína, conferir a estas moléculas efectos comportamentales similares. Sin embargo, su estudio en diferentes modelos animales han establecido diferencias entre los dos tipos de sustancias.

4.3.1. Estimulación locomotora

La estimulación locomotora es el efecto de referencia de drogas estimulantes psicomotoras. La mayoría de los inhibidores de la captura de DA incrementan de manera dependiente de la dosis la actividad ambulatoria de los

animales. A dosis demasiado elevadas, la actividad puede seguir incrementada aunque a niveles menores que los mantenidos por dosis moderadas, o puede disminuir, dando paso a estereotipias motoras. Por el contrario, los análogos de la BZT muestran diferencias en la efectividad de la estimulación locomotora (Katz *et al*, 1999; Katz *et al*, 1997). Estudios de dosis respuesta llevados a cabo con cocaína, han mostrado que la droga produce una curva en forma de campana, donde las dosis intermedias son las que ejercen el efecto mayor. Varios análogos de la BZT muestran efectos máximos menores que los exhibidos por la droga. Análogos con sustituciones de fluor en los anillos difenil éter en posición *para*, muestran una actividad menor que la cocaína aunque bastante próxima. Otros compuestos con sustituciones de cloro, que mantienen una afinidad elevada por el DAT aunque menor que los análogos que presentan sustituciones de fluor, presentan una eficacia mucho menor que la cocaína en estimular la actividad locomotora.

4.3.2. Efectos subjetivos

En ratas entrenadas a discriminar entre inyecciones de cocaína y salino, la mayoría de los inhibidores de la captura de monoaminas con afinidad por el DAT sustituyeron a la droga de manera dependiente de la dosis (Baker *et al*, 1993). Las diferencias en la potencia entre los diferentes inhibidores están generalmente relacionadas con su afinidad por el DAT. Además, inhibidores de la captura de monoaminas con una afinidad mayor por el NET o SERT normalmente no sustituyen a la cocaína (Baker *et al*, 1993). En contra de las evidencias que parecían indicar que inhibidores selectivos del DAT sustitúan a la cocaína, los análogos de la BZT no lo hicieron (Katz *et al*, 1999). Al igual que con la estimulación locomotora, existen diferencias entre los análogos en relación a su efectividad, algo que está relacionado con su estructura química. Análogos con sustituciones de fluor en posición *para*, se han encontrado entre los más efectivos, mientras que análogos con otras sustituciones halogenadas en la misma posición, a pesar de tener afinidades por la unión al DAT similares a aquellos con sustituciones de fluor, son claramente menos efectivos.

4.3.3. Autoadministración

La cocaína, como ha sido documentado en un extenso número de publicaciones, es una sustancia con potentes propiedades reforzantes (Ritz *et al*, 1987). En tareas de autoadministración, el aumento de la dosis hasta dosis moderadas produce un incremento en las tasas de respuesta. A dosis demasiado elevadas, sin embargo, las tasas de respuesta son menores que las mantenidas por dosis intermedias. Los efectos de los análogos de la BZT también han sido evaluados en este paradigma comportamental. En uno de los primeros estudios realizados (Woolverton *et al*, 2000), los efectos de la cocaína se compararon con los de dos de los derivados que presentaban sustituciones con cloro, concretamente el 3'-Cl y 4'-Cl-BZT. Estos análogos fueron testados en monos Rhesus entrenados a autoadministrarse cocaína, bajo un programa de refuerzo de razón fija (FR)¹⁰. Los resultados del estudio indicaron que a diferencia de la cocaína, que mantuvo una tasa de respuestas elevada, ambos análogos mantuvieron los niveles por encima del grupo control pero a un nivel no comparable con el de la cocaína. En un segundo estudio, los efectos de estos dos análogos y del 3'-4'-diCl-BZT fueron comparados con los efectos producidos por la cocaína y el GBR 12909, bajo programas de FR y razón progresiva (PR), en monos Rhesus entrenados a autoadministrarse cocaína (Woolverton *et al*, 2001). Al igual que en estudio anterior, los niveles de los análogos 3'-Cl y 4'-Cl-BZT, se mantuvieron por encima de los niveles del grupo control bajo un programa de refuerzo FR, pero no con el análogo 3'-4'-diCl-BZT, aunque los efectos inducidos fueron mucho más débiles que los alcanzados tanto con la cocaína como con el GBR 12909. Bajo el programa de refuerzo PR, el número de respuestas requeridas para obtener el refuerzo se incrementa de forma progresiva, hasta que el animal deja de responder y alcanza el punto denominado punto de corte o break point. Este valor de break point conseguido por los sujetos, es generalmente considerado con una medida de la efectividad reforzante de la droga (Hodos, 1961). Los resultados obtenidos bajo este programa de refuerzo, establecieron un rango de efectividad reforzante para las drogas testadas, situando a la cocaína seguida del GBR 12909 a la cabeza. Los análogos 3'-Cl y 4'-Cl-BZT, mostraron una eficacia similar y el 3'-4'-diCl-BZT una eficacia menor.

Algunos análogos de la BZT han mostrado tener un potencial de acción más lento que el de la cocaína, hecho que se ha relacionado con la disminución en sus propiedades reforzantes. Sustancias que muestran un modo de acción más lento muestran una capacidad reforzante menor que las que tienen un modo de acción más rápido (Volkow *et al*, 2005).

4.3.4. Preferencia de lugar condicionada

El estudio de sustancias que presentan un modo de acción más demorado, pueden ser evaluadas de manera fiable en procedimientos de CPP, ya que el tiempo entre la administración de la sustancia y la exposición del animal al contexto, es una variable fácilmente manipulable por el experimentador (De Beun *et al*, 1992).

La caja de preferencia de lugar condicionada está compuesta por dos compartimentos fácilmente distinguibles por los animales en cuanto a texturas, olores, iluminación, etc. Los animales son colocados en uno de los dos compartimentos bajo el efecto de una droga y en el otro bajo los efectos de solución salina, de manera que se establece una asociación entre el contexto y los efectos experimentados. Tras varias repeticiones de la fase de condicionamiento, los animales en un estado libre de droga, exploran ambos compartimentos mostrando una cierta preferencia por uno de ellos respecto al otro.

En un estudio se evaluó la preferencia de lugar inducida por los análogos de la BZT (Li *et al*, 2005). El tiempo entre la administración de las sustancias y el emplazamiento del animal en la caja varió entre los 0 y los 90 minutos. El análogo con sustitución N-metil, el AHN-1055, no mostró ningún efecto a ninguna de las dosis ni a ninguno de los tiempos en los que fue testado. Sin embargo, los análogos AHN-2055 y JHW 007, produjeron una preferencia de los animales por el compartimento asociado a la droga, pero sólo cuando el tiempo entre la administración y la exposición fue de 45 minutos. A diferencia de estas sustancias, la cocaína indujo una clara preferencia de lugar en los animales.

Estos resultados, junto con los comentados anteriormente obtenidos de experimentos de autoadministración, ponen de manifiesto que los efectos reforzantes y recompensantes de estos análogos de la BZT son menores que los

inducidos por la cocaína, y pueden sugerir que estas diferencias pueden ser debidas a un modo de acción más lento.

4.4. Evidencias in vitro

4.4.1. Efectos moleculares de los análogos de la BZT

Además de mostrar un modo de acción más lento, pueden existir otros factores que expliquen el perfil farmacológico diferencial de los análogos de la BZT. Estudios recientes han aportado evidencias que sugieren que la BZT y algunos de sus derivados se unen al DAT de una manera diferente a como se une la molécula de cocaína (Chen *et al*, 2004b) y estas diferencias moleculares las que pueden estar relacionadas con el modo de acción (Zou *et al*, 2006). Utilizando el modelo de mutagénesis dirigida del aspartato localizado en posición 79 en uno de los segmentos transmembrana del DAT, se mostró que los derivados de la BZT se unen de manera diferente que la cocaína y sus análogos, al igual que otros inhibidores clásicos de la captura de DA (Ukairo *et al*, 2005). Estudios empleando técnicas de fotoafinidad proporcionaron evidencias de que inhibidores del DAT estructuralmente diferentes se unen de manera covalente a diferentes regiones transmembrana del transportador (Agoston *et al*, 1997; Vaughan *et al*, 1999; Vaughan *et al*, 2007). Estos resultados apoyaron la idea de un modo de acción diferente entre ambos tipos de inhibidores de la captura de DA, y sugieron la posibilidad de que se pudieran producir cambios conformacionales en el DAT inducidos por la cocaína y sus análogos, que pudieran explicar su potencial de abuso.

Estudios posteriores sugirieron que el aminoácido tirosina localizado en la posición 335 del DAT es crítico en la regulación de las dos conformaciones con las que puede estabilizarse el transportador. La mutación de esta tirosina por alanina disminuye la potencia de la inhibición de captura de DA de la cocaína (Loland *et al*, 2008; Loland *et al*, 2002), al igual que las de sus análogos y la de los análogos de la BZT, aunque en el caso de estos la potencia de la inhibición es mucho menor, a excepción del MFZ 2-71, que mostró valores cercanos a los de la cocaína y similares a los de su análogo RTI-55 (Loland *et al*, 2008). Estudios de comportamiento revelaron que este análogo produjo una fuerte estimulación de la actividad locomotora y sustituyó a la cocaína en animales entrenados a discriminar

entre la droga y salino, sugiriendo por tanto una correlación entre la disminución de la potencia de inhibición de la captura de DA debido a la mutación, y su efectividad en inducir estimulación locomotora y sustituir por la droga en experimentos de discriminación. Estos datos indican que inhibidores de la captura de DA que presentan diferencias estructurales, estabilizan el DAT mediante distintas conformaciones.

Recientemente se ha sugerido que los análogos de la BZT se unen al DAT preferiblemente cuando se encuentra en una conformación cerrada, mientras que la cocaína y sus análogos lo hacen cuando está en una conformación abierta (Loland *et al*, 2008). Estas diferencias en la preferencia por la conformación del DA predicen los comportamientos comportamentales inducidos por ambos tipos de moléculas y es posible que las preferencias de los análogos afecten a su modo de acción, que su vez podría contribuir a las diferencias comportamentales observadas.

4.4.2. Diferencias entre acciones *in vivo* e *in vitro* de los análogos de la BZT

El hecho de que los análogos de la BZT posean efectos *in vitro* que predicen un efecto generalmente no observado *in vivo*, ha sugerido que éstos podrían tener una penetración relativamente baja en el sistema nervioso central. Sin embargo, estudios farmacocinéticos han mostrado en ratas concentraciones elevadas de algunos de estos análogos en el cerebro algunos minutos después de haber sido administrados. Además, con tasas de eliminación muchos más lentas que las mostradas por la cocaína (Raje *et al*, 2003). Todos los análogos han sido detectados a concentraciones iniciales comprendidas entre los 4-15 µg por gramo de tejido, de manera que parecen encontrarse disponibles en el cerebro a concentraciones adecuadas para poder interactuar con el DAT en un periodo corto de tiempo después de su administración (Newman and Katz, 2009).

Estudios que comparando los efectos del análogo 4'-Cl-BZT con los de la cocaína en su capacidad para incrementar los niveles extracelulares de DA en diferentes regiones cerebrales incluyendo el NAc *core* y *shell*, PFC y caudado dorsal (Tanda *et al*, 2005; Tolliver *et al*, 1999) han mostrado que ambas sustancias producen un incremento de los niveles de DA en todas las regiones. A dosis comparables el efecto del análogo sobre la concentración de DA fue menor que el

inducido por la cocaína en todas ellas con excepción de la PFC. La mayor diferencia observada entre el análogo 4'-Cl-BZT y la cocaína, fue el hecho de que la duración de los efectos del primero fue mucho más prolongada en el tiempo, llegando a mantener el nivel extracelular de DA elevado hasta 5 horas después de su administración. Estos efectos duraderos son consistentes con la lenta tasa de eliminación de estos análogos.

El lento incremento de la concentración de DA producida por los análogos parece entrar en conflicto con los resultados obtenidos de estudios farmacocinéticos que indican que los compuestos se encuentran disponibles en el cerebro y a concentraciones adecuadas para interaccionar con el DAT sólo minutos después de ser administrados. Estudios de desplazamiento del DAT del análogo de la cocaína [125I]RTI-121, indicaron que la cocaína desplaza a su análogo de manera dependiente de la dosis y del tiempo. El máximo desplazamiento obtenido con la cocaína se alcanzó 30 minutos después de ser administrada. Los análogos estudiados, el AHN-1055, AHN-2005 y el JHW 007, también produjeron un desplazamiento dependiente de la dosis y del tiempo, pero alcanzaron el máximo 150 (AHN-1055 y AHN-2005) y 270 (JHW 007) minutos después de su administración (Desai *et al*, 2005a; Desai *et al*, 2005b).

Algunos efectos agudos inducidos por la cocaína, como la actividad locomotora incrementada, son observables rápidamente después de su administración, alcanzando el máximo efecto aproximadamente a los 30 minutos desde su administración. Alcanzado este punto máximo, los efectos comienzan a disminuir durante unas dos horas estando ausentes pasado este tiempo. Los análogos, por el contrario, muestran los máximos efectos entre 90 y 120 minutos tras la inyección y éstos persisten durante un periodo de 8 horas (Desai *et al*, 2005b). Ninguno de los análogos mostró ser más efectivo que la cocaína en la inducción de la actividad locomotora. Trabajos anteriores han propuesto una correlación entre la tasa de ocupación de DAT y los efectos locomotores inducidos por la cocaína (Kuhar *et al*, 1991). Además la tasa de ocupación entre la droga y el DAT parece correlacionar con la inducción de sus efectos reforzantes (Volkow *et al*, 2002). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que esta correlación no es tan fuerte como inicialmente se predijo. Esta tasa de asociación fue estudiada para el análogo JHW 007 y se estableció que era aproximadamente 10 veces más

lenta que la de la cocaína, mostrando además la menor eficacia reforzante entre todos los análogos testados. Sin embargo, 4.5 horas después de la administración, el desplazamiento de [125I]RTI-121 producido por el JHW 007 a dosis elevadas, fue comparable al producido por las dosis más estimulantes de cocaína (Desai *et al*, 2005b). El descubrimiento de que el el JHW 007, a pesar de producir una significativa ocupación del DAT, carecía de efectos estimulantes, en contraste con la cocaína, estimuló la realización de estudios que pudiesen determinar sus potencial efecto antagonista sobre la cocaína. De esta forma, estudios posteriores mostraron que la cocaína produjo incrementos en la actividad locomotora de manera dependiente de la dosis, alcanzando su máximo a los 40 mg/kg. Sin embargo, con un pretratamiento de JHW 007 (administrado 4 horas antes) los efectos estimulantes de la cocaína se atenuaron significativamente (Desai *et al*, 2005b). Otros inhibidores de la captura de DA, con el GBR 12909 (Katz *et al*, 2003b) o WIN 35,428 (Katz *et al*, 2004), cuando fueron administrados en combinación con la cocaína, produjeron desplazamientos dependientes de la dosis de la curva dosis-efecto hacia la izquierda (potenciaban los efectos estimulantes de la cocaína). Por lo tanto, como muestran estos estudios, algunos análogos de la BZT, a pesar de presentar una alta afinidad por el DAT, son capaces de antagonizar algunos efectos de la cocaína.

5.- AGONISTAS TAAR1

5.1. Introducción

Las aminas endógenas de traza (TAs) están estructuralmente relacionadas con los neurotransmisores monoaminérgicos clásicos y se encuentran en muy bajas concentraciones en el cerebro de los mamíferos. Los recientemente descubiertos receptores asociados a aminas de traza (TAARs), constituyen importantes dianas moleculares, no sólo para estas aminas endógenas si no también para una variedad de compuestos con actividad monoaminérgica incluyendo las anfetaminas y otros metabolitos. El receptor TAAR1 (trace amine-associated receptor 1), es el receptor mejor caracterizado de esta clase, y el único conservado en el cerebro del mamífero, aunque poco se sabe todavía sobre su regulación y función.

Los receptores TAAR pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), y se encuentran localizados tanto en células presinápticas como postsinápticas. El descubrimiento de esta nueva familia de receptores que pueden ser activados por un pequeño grupo de aminas endógenas derivadas del metabolismo de los aminoácidos, produjo un gran entusiasmo en este campo, dado el creciente interés en la transmisión monoaminérgica por parte de farmacólogos clínicos y experimentales (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001). Entre las monoaminas descubiertas encontramos la tiramina, triptamina, sinefrina, octopamina y la feniletilamina (PEA) (Boulton, 1980b; Branchek and Blackburn, 2003; Premont *et al*, 2001; Sandler *et al*, 1980). En invertebrados, que carecen de sistema noradrenérgico, la octopamina y la tiramina son los principales neurotransmisores y neuromoduladores y están implicados en la mayoría de las funciones vitales como son el movimiento, la alimentación, y las reacciones frente al estrés. Sin embargo, el papel de estas TAs en la fisiología de los mamíferos no está tan caracterizado. En general, en los vertebrados las TAs se presentan en concentraciones bajas en muchos de los tejidos, incluyendo el tejido cerebral (Boulton, 1980b; Branchek *et al*, 2003; Sandler *et al*, 1980). La tasa de síntesis de las TAs es comparable a la tasa de síntesis de monoaminas clásicas, de manera que los bajos niveles de las TAs que se encuentran en el cerebro pueden estar determinados por una velocidad de metabolización muy rápida o por una incapacidad de estas sustancias de almacenarse en vesículas sinápticas en el

citosol de las células (Grandy, 2007). Como se ha comentado anteriormente, las TAs están estructuralmente relacionadas con las monoaminas clásicas, así como con otras sustancias psicoestimulantes como la anfetaminas y sus derivados. De hecho, una de las TAs más conocidas, la β -PEA, difiere de la anfetamina sólo en un grupo metil en la posición α , por lo que ha sido considerada como la “anfetamina endógena” (Janssen *et al*, 1999). Aunque la función de las TAs en mamíferos sigue sin conocerse, distintos estudios han mostrado que los niveles de estas moléculas podría encontrarse alterado en pacientes que padecen trastornos mentales como esquizofrenia, Parkinson, trastorno de atención con hiperactividad, síndrome de Tourette o fenilcetonuria (Boulton, 1980a; Sandler *et al*, 1980). Se ha postulado que las TAs afectan el sistema de las monoaminas de manera indirecta interaccionando con los transportadores de membrana, como el DAT, o con las vesículas donde se almacenan los neurotransmisores (Berry, 2004; Branchek *et al*, 2003; Premont *et al*, 2001; Sotnikova *et al*, 2004). De hecho, existen evidencias que sugieren que las TAs pueden funcionar como falsos neurotransmisores, desplazando a las monoaminas clásicas de sus vesículas de almacenamiento, de modo similar a como lo hacen las anfetaminas y sus derivados. Además, a niveles fisiológicos, estas sustancias tienen generalmente un efecto menor sobre la excitabilidad neuronal en ausencia de estas monoaminas clásicas pero alteran las respuestas neuronales de estos transmisores (Berry, 2004; Branchek *et al*, 2003; Premont *et al*, 2001). Sin embargo, el descubrimiento de una familia específica de GPCR, en la que algunos de sus miembros son activados por TAs (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001), ha proporcionado una evidencia sólida para un mecanismo directo mediante el cual estas aminas podrían estar modulando la actividad neuronal.

5.2. Receptores asociados a aminas de traza

Aunque los sitios de unión para la triptamina, tiramina y β -PEA fueron previamente descritos en el cerebro de rata (Berry, 2004; Boulton, 1980b; Sandler *et al*, 1980), la identificación los TAAR ha proporcionado una evidencia directa que otorga a estas monoaminas un papel en la neurotransmisión (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001). Sólo dos miembros de estas familia de receptores, TAAR1 y TAAR4, han mostrado ser sensibles a las TAs (Borowsky *et al*, 2001;

Bunzow *et al*, 2001; Lindemann *et al*, 2005a), mientras que otros receptores no lo son (Lindemann *et al*, 2005a), y algunos TAARs son sensibles a algunas aminas volátiles (Liberles and Buck, 2006). Basado en el hecho de que algunos miembros de esta familia de receptores podrían no responder a TAs, y parcialmente basado en el orden de la localización cromosómica de sus genes, la nomenclatura propuesta para estos receptores fue receptores asociados a aminas de traza, TAARs (Lindemann and Hoener, 2005b).

Análisis filogenéticos han revelado que la familia de los TAAR parece haberse originado a partir de un gen antecesor común que presenta una gran afinidad con el gen del receptor de serotonina humano 5-HT₄, posiblemente debido a duplicaciones (Lindemann *et al*, 2005a). Existen diferencias en el número de genes TAAR entre especies. Por ejemplo, en ratas se han descrito 19 genes TAAR, 16 en ratones, 9 en chimpancés y humanos (Lindemann *et al*, 2005a; Lindemann *et al*, 2005b). Liberles y colaboradores (Liberles *et al*, 2006) han mostrado que prácticamente todos los TAAR, con excepción del TAAR1, están localizados exclusivamente en el epitelio olfatorio, estando prácticamente ausentes o con una expresión muy baja en los demás tejidos corporales y cerebrales. Este hecho es controvertido dado que otros grupos han encontrado TAAR1 en varias regiones cerebrales y en el sistema nervioso periférico (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001; Grandy, 2007; Lindemann *et al*, 2008), mientras que otros TAAR como TAAR5, TAAR6 y TAAR9, han sido detectados en el sistema nervioso central de humanos y órganos periféricos (Borowsky *et al*, 2001; Zeng *et al*, 1998).

5.3. Bioquímica y farmacología del TAAR1

El TAAR1 es el miembro de la familia TAAR mejor caracterizado (Grandy, 2007). Se encuentra acoplado a proteínas G y se activa, además de por TAs entre las que se encuentran la β -PEA y la tiramina, por metabolitos de las catecolaminas e iodotiroaminas y por varios compuestos conocidos por afectar la transmisión monoaminérgica (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001). La anfetamina, MDMA y otros compuestos relacionados son también capaces de activar a los TAAR1 *in vitro*. En el sistema nervioso central de ratones, los RNA mensajeros (RNAm) de los TAAR1 se distribuyen a través del sistema límbico y en regiones que contienen los cuerpos celulares catecolaminérgicos y sus proyecciones, como

son el *locus ceruleus*, la *substantia nigra*, el VTA, el dorsal del rafe, el estriado y los ganglios basales (Borowsky *et al*, 2001). En ratas aparece distribuido por todo el cerebro, siendo en el bulbo olfatorio, NAc/tubérculo olfatorio, regiones corticales, sustancia negra, VTA, cerebelo y médula, las regiones en las que se ha encontrado la mayor expresión. En la periferia, el RNAm se ha encontrado en el hígado, riñón, tracto gastrointestinal, páncreas y corazón (Bunzow *et al*, 2001). En monos Rhesus, una significativa expresión de RNAm de TAAR1 y proteína ha sido descrita en áreas dopaminérgicas, como la *substantia nigra* y el estriado (Xie *et al*, 2007b). Estos datos demuestran que el TAAR1 está ampliamente expresado en áreas monoaminérgicas del cerebro en las que podría ejercer un papel en la modulación de la activación motora y comportamientos motivados, tradicionalmente asociados con la actividad de estos sistemas.

El estudio de la farmacología del TAAR1 en sistemas celulares heterólogos *in vitro* ha sido complicado, principalmente porque el receptor permanece en el espacio intracelular cuando es expresado de forma heteróloga en líneas celulares (Bunzow *et al*, 2001; Grandy, 2007; Miller *et al*, 2005; Reese *et al*, 2007; Wainscott *et al*, 2007; Wolinsky *et al*, 2007). En general, debido a su baja expresión en sistemas celulares heterólogos, el TAAR1 exhibe una reducida capacidad de señalización que puede ser compensada por el reemplazamiento de partes de su secuencia génica o de la proteína G asociada (Bunzow *et al*, 2001; Lindemann *et al*, 2005b; Reese *et al*, 2007; Wainscott *et al*, 2007). El TAAR1 de humanos es particularmente complicado de expresar en sistemas celulares heterólogos, y modificaciones adicionales en el receptor son necesarias para que sea expresado de forma fiable. Incluso con estas modificaciones (Bunzow *et al*, 2001; Miller *et al*, 2005; Reese *et al*, 2007; Wainscott *et al*, 2007; Wolinsky *et al*, 2007), su expresión se da principalmente en el espacio intracelular y se ha conseguido una baja expresión del receptor en las membranas. Estas limitaciones tienen una relevancia fundamental para los experimentos farmacológicos, ya que la densidad del receptor y de la proteína Gs pueden afectar la potencia y eficacia del agonista en ensayos celulares *in vitro* (Kenakin and Morgan, 1989). Aunque publicaciones recientes indican que puede conseguirse una expresión permanente del TAAR1 en algunas líneas celulares (Navarro *et al*, 2006; Wainscott *et al*, 2007), el problema de una expresión fiable en la membrana tanto del TAAR1 como de otros TAAR

continúa siendo el mayor problema en estudios farmacológicos *in vitro* (Barak *et al*, 2008; Grandy, 2007).

A pesar de estas dificultades, varios grupos de investigación han confirmado las observaciones anteriores demostrando una potente actividad agonista las TAs β -PEA y tiramina sobre el TAAR1 (Barak *et al*, 2008; Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001; Grandy, 2007; Lindemann *et al*, 2005b; Miller *et al*, 2005; Navarro *et al*, 2006; Reese *et al*, 2007; Wainscott *et al*, 2007; Wolinsky *et al*, 2007). También ha sido descrita una actividad relativamente más débil de la octopamina y triptamina sobre el TAAR1 tanto de ratas como de humanos (Barak *et al*, 2008; Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001; Lindemann *et al*, 2005b; Miller *et al*, 2005; Navarro *et al*, 2006; Wainscott *et al*, 2007). Hay que mencionar que se han descrito diferencias sustanciales entre las afinidades de las TAs por los receptores TAAR en diferentes especies. En general se ha encontrado que la β -PEA es un agonista mucho más potente que la tiramina en el TAAR1 de humanos y ratones, mientras que en ratas es al contrario (Grandy, 2007).

Las anfetaminas comparten una estructura similar con la feniletilamina. El hecho de que esta sustancia sea hasta la fecha la mejor caracterizada en relación a su actividad sobre el TAAR1 (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001; Lindemann *et al*, 2005b), ha promovido la investigación sobre la posibilidad de que las anfetaminas pudieran actuar directamente sobre el receptor (Bunzow *et al*, 2001). Los estudios iniciales han indicado que varios derivados de la anfetamina, incluyendo la d-anfetamina, l-anfetamina, d-metanfetamina y MDMA, pueden inducir un incremento en el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en células renales embrionarias de humanos que expresan TAAR1 de ratas. Otros grupos de investigadores han confirmado estos resultados en ratones, ratas, monos Rhesus, y TAAR1 humanos expresados en varios sistemas celulares heterólogos (Barak *et al*, 2008; Miller *et al*, 2005; Reese *et al*, 2007; Wainscott *et al*, 2007; Wolinsky *et al*, 2007; Xie *et al*, 2007b). Estos estudios han confirmado que un gran número de derivados de las anfetaminas pueden activar los receptores TAAR1 *in vitro*. Es importante mencionar que el rango de concentraciones de d-anfetamina y MDMA que pueden actuar sobre los TAAR1 son concentraciones que pueden ser alcanzadas e incluso superadas en personas adictas a estas sustancias (Asghar *et al*, 2003; Peters *et al*, 2003). Es por tanto altamente probable que la activación de

los TAAR1 por los derivados de la anfetamina pueda tener consecuencias fisiológicas significativas *in vivo*, y que el TAAR1 pueda estar por tanto ejerciendo alguna función en procesos neuronales que son relevantes en los trastornos relacionados con el consumo o en las respuestas inducidas por la anfetamina y sus derivados.

5.4. Ratones deficientes en TAAR1

Las primeras evidencias a cerca del papel funcional de los TAAR1, fue obtenido empleando ratones modificados genéticamente carentes de estos receptores TAAR1 (ratones *TAAR1-knockout*, *KO*). Hasta ahora, todas las moléculas endógenas que se ha demostrado que actúan como agonistas de los receptores TAAR1, tienen acciones también a nivel del sistema nervioso central, uniéndose a otras dianas como son el DAT y los VMAT2. En ausencia de ligandos selectivos para el TAAR1, ratones que carecen del receptor, *TAAR1-KO*, representaban el único camino disponible para evaluar las posibles consecuencias fisiológicas que supone la ausencia de estos receptores y su papel sobre las acciones farmacológicas que ejercen otras moléculas. En un estudio inicial, se observó que los ratones *TAAR1-KO*, presentaban un fenotipo normal, se reproducían satisfactoriamente y no mostraban diferencias en comparación con ratones *wild-type* en tests neurológicos y comportamentales (Wolinsky *et al*, 2007). Sin embargo, los ratones *TAAR1-KO*, sí mostraron un déficit significativo en test de inhibición prepulso, indicando una deficiencia en el *input* sensoriomotor. Déficit que es manifiesto en personas que sufren esquizofrenia y otros trastornos como trastornos neuropsiquiátricos como trastorno obsesivo-compulsivo o síndrome de Gilles de la Tourette (Kohl *et al*, 2013; Wolinsky *et al*, 2007). Además, los ratones *TAAR1-KO* muestran una incrementada sensibilidad a los efectos locomotores estimulantes inducidos por la d-anfetamina y un mayor aumento en los niveles extracelulares de monoaminas tras la administración de esta droga en estudios de microdialisis *in vivo* (Wolinsky *et al*, 2007). En condiciones normales, estos ratones no muestran niveles anormales de actividad locomotora, ni de los niveles extracelulares de DA. Además, registros electrofisiológicos en el ATV, revelaron tasas de disparo espontáneo incrementadas en las neuronas dopaminérgicas de estos animales (Lindemann *et al*, 2008). Experimentos recientes con este modelo muestran además una fuerte

interacción de los TAAR1 con los autoreceptores D2. El agonista TAAR1 RO5166017 sólo fue capaz de potenciar los efectos inhibitorios del incremento de DA extracelular en ratones *wild type* (Leo *et al*, 2014). Asimismo, muestran supersensibilidad postsináptica de los receptores D2 (pero no D1) (Espinoza *et al*, 2015).

Muchos ligandos de los TAAR1, incluyendo la β -PEA y las anfetaminas, han demostrado una potente interacción con el DAT, complicando aún más la identificación de la función mediada por estos receptores. Ratones DAT *knock-out*, han proporcionado una oportunidad única para investigar las acciones independiente de los DAT de los compuestos (Gainetdinov and Caron, 2003; Giros *et al*, 1996). Además, estos ratones carentes de DAT sirven de modelo para investigar las acciones inhibitorias de las anfetaminas sobre la hiperactividad, característica de las anfetaminas que se considera importante para sus propiedades terapéuticas en el tratamiento de ADHD (Gainetdinov *et al*, 2003; Gainetdinov *et al*, 1999). Hay que mencionar que el agonista TAAR1 mejor caracterizado hasta la fecha, la β -PEA, comparte con la anfetamina la capacidad inducir la inhibición de la hiperactividad dependiente de DA en ratones DAT-*KO* (Gainetdinov *et al*, 1999; Sotnikova *et al*, 2004). Por tanto, el nuevo reto fue conseguir un raton deficiente tanto para TAAR1 como para DAT y analizar directamente los efectos de la anfetamina en estos dobles mutantes. Los ratones que carecen de DAT/TAAR1 son viables y exhiben niveles significativamente elevados de actividad locomotora espontánea en comparación con sus ratones progenitores DAT-*KO*. Curiosamente, tanto la d-anfetamina como la β -PEA, la cual produce un efecto inhibitorio en ratones DAT-*KO* (Gainetdinov *et al*, 1999; Sotnikova *et al*, 2004), fueron substancialmente menos potentes en este aspecto en los dobles mutantes. Éstos, junto con otros experimentos (Sotnikova *et al*, 2008), han sugerido que los TAAR1 deben de tener un papel inhibitorio en relación a la hiperactividad locomotora dependiente de DA, y por lo tanto una deficiencia o antagonismo de estos receptores puede incrementar los comportamientos y las funciones dependientes de DA, mientras que los agonistas TAAR1 podrían inhibirlo.

También se han desarrollado ratones que sobreexpresan TAAR1 (Revel *et al*, 2012a). Al igual que los *knock out* estos animales no muestran anormalidades en condiciones normales. Sin embargo, estos animales mostraron niveles incrementados de DA y NA en el nucleus accumbens y en el mPFC. *In vitro* este hecho correlacionó con una elevada tasa de disparo espontánea de neuronas monoaminérgicas en el área tegmental ventral, núcleo dorsal del rafe y locus ceruleus como resultado de la sobreexpresión. Además, estos animales mostraron hiposensibilidad a los efectos psicoestimulantes de la amfetamina, mostrando niveles menores de estimulación locomotora y de liberación de catecolaminas en el nucleus accumbens. La atenuación de la actividad de los receptores TAAR1 mediante el agonista parcial RO5073012 reestableció los efectos estimulantes que en condiciones normales inducía la administración de amfetamina.

En relación a la implicación de los TAAR1 en el mecanismo de acción de las amfetaminas y en la regulación de la transmisión monoaminérgica, tres posibilidades están actualmente bajo investigación. La primera, los TAAR1 pueden actuar directamente sobre los DAT, por lo que afectan a la transmisión dopaminérgica a través de la modulación de la función del transportador. Estudios recientes han demostrado coexpresión de TAAR1 y DAT en un subgrupo de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra de ratones y monos Rhesus y la activación del TAAR1 modulada por transportadores de monoaminas (Xie and Miller, 2007a; Xie *et al*, 2007b). Esta interacción puede explicar el incremento en la liberación de DA tras la administración de amfetamina en ratones TAAR1-KO (Wolinsky *et al*, 2007). La segunda posibilidad sugiere que los TAAR1 localizados en los cuerpos celulares de las neuronas monoaminérgicas pueden modular directamente la actividad de estas neuronas como respuesta a varios compuestos activos sobre los TAAR1 (Lindemann *et al*, 2008; Mercuri and Bernardi, 2005). Por último, es posible que los TAAR1 interactúen directamente sobre los receptores de DA o como intermediarios en algún punto de la cascada de señalización, ejerciendo por tanto una importante influencia en la modulación de la neurotransmisión dopaminérgica. De hecho, se ha observado que la activación del TAAR1 debido a las altas concentraciones de DA puede ser bloqueado por la activación simultánea de los receptores D2 y estos efectos D2 pueden ser revertidos por la

administración del antagonista racloplide, sugiriendo que la activación de estos TAAR1 puede ser regulada por el receptor D2 cuando ambos receptores son coexpresados en la misma célula (Xie *et al*, 2007b).

El mayor reto de cara a futuras investigaciones es entender el papel de los receptores TAAR1 en las funciones y acciones fisiológicas de compuestos biológicamente activos *in vivo*. Estas investigaciones podrían proporcionar información relevante en relación al potencial terapéutico de agonistas y antagonistas TAAR1. Estudios *in vitro* han establecido que algunas TAs, anfetaminas y metabolitos de las monoaminas, son potentes y eficaces agonistas de los receptores TAAR1 con perfiles farmacológicos dependientes de la especie. Por ejemplo, dado que los valores EC50 de la anfetamina, valores de concentración de droga que inducen la respuesta media, son comparables con las concentraciones encontradas en algunos pacientes adictos, es altamente probable que los TAAR1 medien en algunos de los efectos específicos de estas drogas en humanos (Grandy, 2007). Este hecho sugiere además que variaciones genéticas en los receptores TAAR1 en humanos podría ser un factor importante que predisponga al abuso de anfetaminas u otras sustancias. A parte de esto, si se puede probar que estos receptores median algunas de las acciones *in vivo* de la anfetamina, el desarrollo de nuevos agonistas selectivos para los TAAR1 y antagonistas, pueden aportar un nuevo enfoque para el tratamiento de la adicción a la anfetamina y/o trastornos cerebrales en los que la anfetamina es utilizada clínicamente. Concretamente, ya que la anfetamina ha permanecido como el tratamiento farmacológico más efectivo para el ADHD durante muchos años, el papel del TAAR1 en la eficacia paradójica de la anfetamina en este trastorno debería ser explorado.

En general, debido a la importante implicación que parecen tener las TAs en la patología de muchos desórdenes cerebrales, el desarrollo de moléculas agonistas y antagonistas de estos receptores TAAR1 representa un avance de gran avance para la exploración de estos receptores.

5.5. Ligandos de TAAR1 y psicofarmacología de drogas de abuso.

Desde que se realizaron los experimentos incluidos en la presente tesis doctoral ha habido importantes novedades en la evaluación de estos compuestos. El reciente desarrollo de agonistas altamente selectivos del TAAR1 y su evaluación

en modelos preclínicos de drogas de abuso refuerzan su potencial para el desarrollo de terapias dirigidas al tratamiento de la adicción de psicoestimulantes. Los agonistas TAAR1 desarrollados muestran una gran selectividad sobre otros receptores, enzimas y canales iónicos y sitios de unión. El uso de estos ligandos ha favorecido la aparición de un gran número de estudios centrados en el estudio de estos receptores en el contexto de la adicción a psicoestimulantes. Los trabajos que se describen a continuación fueron publicados posteriormente al desarrollo de los experimentos descritos en la presente tesis.

El tratamiento mediante los agonistas R05166017, R05203648, R05256390, R05073012 y R05263397 ha mostrado efectos inhibitorios sobre la hiperlocomoción inducida por cocaína, antagonistas NMDA o fenciclidina (Galley *et al*, 2012; Revel *et al*, 2011; Revel *et al*, 2013). Asimismo, el agonista completo R05166017 y el agonista parcial R05203648 han mostrado efectos inhibitorios de la actividad locomotora en ratones DAT^{-/-}. Estos datos son consistentes con los datos que se presentan en la presente tesis, sugiriendo que la activación de TAAR1 inhibe la hiperlocomoción inducida por psicoestimulantes, y que el DAT no es el principal mediador de los efectos del TAAR1 sobre la actividad dopaminérgica (Revel *et al*, 2011).

Los agonistas TAAR1 han mostrado efectos inhibitorios de la sensibilización inducida por cocaína (Thorn *et al*, 2014) y metanfetamina (Cotter *et al*, 2015). El tratamiento agudo con el agonista parcial R05263397 no tuvo efectos sobre la actividad locomotora, ni afectó significativamente la estimulación locomotora inducida por cocaína. Además, la administración de R05263397 junto con la cocaína durante 7 días bloqueó la inducción de sensibilización locomotora (Thorn *et al*, 2014). De la misma forma, R05263397 redujo la expresión de sensibilización inducida por una dosis de cocaína tras un periodo sin droga de una semana. Resultados similares han sido mostrados por Cotter y colaboradores (Cotter *et al*, 2015) mostrando como la coadministración de R05203648 es capaz de bloquear tanto la adquisición de la sensibilización de metanfetamina en un régimen de administración de 14 días, como la expresión de ésta 3 días más tarde tras la administración de una dosis subóptima de metanfetamina.

Un reciente trabajo de nuestro laboratorio mostró que tanto el agonista completo R05256390 como el agonista parcial R05263397 producen una

atenuación de la eficacia reforzante de la cocaína con un amplio rango de dosis de cocaína testadas. Asimismo, ambos agonistas bloquearon los efectos reductores del umbral de refuerzo inducidos por la cocaína utilizando un paradigma de autoestimulación intracraneal (Pei *et al*, 2015). Similares resultados se han mostrado en otro trabajo en el que el agonista R05263397 atenuó la curva dosis-respuesta de la cocaína (Thorn *et al*, 2014). Además el mismo grupo también ha publicado efectos similares con un modelo de sensibilización de metanfetamina (Jing *et al*, 2015). También el agonista parcial R05263397 se ha mostrado capaz de atenuar la expresión, pero no el desarrollo de CPP inducido por cocaína (Thorn *et al*, 2014).

En paradigmas de autoadministración, estudios posteriores a los experimentos descritos en la presente tesis han mostrado que el agonista parcial R05203648 es capaz de producir una disminución de la habilidad de la cocaína para sostener el comportamiento operante, aumentando el tiempo necesario para alcanzar el *breaking point* de autoadministración de cocaína. En la misma tarea el agonista incrementó la eficacia reforzante para comida (Pei *et al*, 2014). Mediante un paradigma de análisis basado en economía conductual el agonista parcial R05263397 incrementó la elasticidad de la curva de demanda de cocaína indicando que la activación de TAAR1 podría estar reduciendo la eficiencia reforzante de la cocaína (Thorn *et al*, 2014). Además, el R05203648 es capaz de reducir la autoadministración de metanfetamina además de no mantener el consumo si es administrado como droga sustitutiva en ratas con una historia estable de consumo de esta droga (Cotter *et al*, 2015). El otro agonista parcial disponible, el R05263397, también ha mostrado efectos moduladores de la autoadministración de metanfetamina (Jing *et al*, 2015). Además, el agonismo parcial TAAR1 reduce la acumulación de DA en el núcleo accumbens inducida por la cocaína. El conjunto de estas evidencias subrayan el importante potencial de la acción de estos receptores en la modulación de las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes.

Trabajos recientes han mostrado también importantes evidencias de la capacidad del agonismo de estos receptores para reducir de forma la búsqueda de droga en modelos de recaída. Trabajos recientes en nuestro laboratorio han mostrado utilizando un modelo de recaída inducida por contexto que tanto el

agonista parcial como el total, R05203648 and R05256390 son capaces de reducir de forma muy significativa la búsqueda de droga tras un periodo de dos semanas de abstinencia forzada. Asimismo, el R05203648 mostró también eficacia reduciendo los efectos de la recaída inducida por cocaína (tras un periodo de extinción) (Pei *et al*, 2014). Esta droga no afectó sin embargo la búsqueda de reforzadores naturales. En otros trabajo, el R05203648 también ha mostrado eficacia con el uso de modelos de extinción-recaída, reduciendo la recaída inducida tanto por la reexposición a la droga como por estímulos asociados a ésta, tanto con cocaína como con metanfetamina (Jing *et al*, 2015).

En definitiva, este conjunto de trabajos recientes subrayan el importante potencial de esta diana biológica no solo para elucidar los efectos de los psicoestimulantes sino también para el desarrollo de nuevas farmacoterapias que ayuden en el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La adicción a los psicoestimulantes como la cocaína o la metanfetamina es un grave trastorno con devastadoras consecuencias clínicas, sociales y económicas. Sin embargo, hasta la fecha no existen farmacoterapias efectivas que favorezcan la abstinencia y que eviten la recaída en su consumo.

La evaluación preclínica de nuevas moléculas con potencial para su uso como tratamiento es una línea de investigación vigente y relevante. Es en este contexto general en el que se enmarcan los estudios descritos en esta tesis doctoral. Así pues, el principal objetivo de los trabajos descritos es evaluar en diferentes modelos animales de adicción dos inhibidores atípicos de la recaptación de DAT, AHN-1055 y el JHW-007, análogos de la molécula de BZT bajo la premisa que podrían coincidir con un perfil compatible con aquella que cabe esperar de una medicación agonista sustitutiva. Por tanto, con el fin de determinar hasta qué punto estas novedosas moléculas podrían ser efectivas como farmacoterapia en la adicción a psicoestimulantes como la cocaína y la metanfetamina, los trabajos planteados establecieron una serie de objetivos específicos:

- Determinar los efectos estimulantes inducidos por ambos análogos de la BZT en ratas, y su capacidad de modular los efectos psicomotores inducidos por cocaína y metanfetamina.
- Evaluar la acción de estas moléculas sobre la autoadministración de cocaína y metanfetamina en animales con una pauta de consumo estable.
- Estudiar la eficacia reforzante de estas sustancias mediante estudios de autoadministración en programas operante de razón fija y progresiva.
- Determinar si en el caso de ser autoadministradas dichas sustancias producirán el ansia de consumo típico de los psicoestimulantes clásicos tras un periodo de abstinencia.
- Evaluar en ratas consumidoras de cocaína la capacidad del AHN-1055 para funcionar como droga sustitutiva y determinar hasta qué punto este tratamiento pudiera tener efectos sobre la recaída.
- Establecer si con este tratamiento sustitutivo se prevendrían algunos de los cambios neuroquímicos que han sido relacionados con la inducción de

craving o ansia de consumo y la búsqueda activa de cocaína en animales abstinentes.

Por otra parte, como hemos comentado en la introducción, las TAs pueden tener importantes implicaciones en la patología de muchos desórdenes, incluyendo la adicción a las drogas. El descubrimiento de agonistas selectivos y antagonistas de los TAAR1 facilita un nuevo enfoque plausible para el estudio y tratamiento del abuso a psicoestimulantes. Enmarcado dentro de estas hipótesis, se realizaron una serie de estudios con algunos agonistas TAAR, concretamente con los compuestos R05203648, R05256390 y R05106017 con selectividad total o parcial por el receptor TAAR1, que abarcaron los siguientes objetivos:

- Determinar las propiedades estimulantes inducidas por estos compuestos y probar la manera en la que modulan los efectos estimulantes inducidos por la cocaína y metanfetamina.
- Determinar las propiedades recompensantes inducidas por el compuesto C empleando el modelo de preferencia de lugar condicionada y cómo la administración de este agonista como pretratamiento influiría en la recompensa inducida por cocaína.
- Establecer mediante estudios de autoadministración cómo el pretratamiento con el agonista parcial R05203648 afectaría sobre el consumo de cocaína en ratas con un historial estable de autoadministración.
- Siguiendo con este modelo de autoadministración, nos planteamos el objetivo de estudiar la influencia de los agonistas parcial y completo R05203648 y R05256390, respectivamente sobre la obtención de un refuerzo natural como es la sacarosa, utilizando para ello programas de refuerzo fijo y progresivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. -SUJETOS

Para la realización de los experimentos que se presentan en esta tesis doctoral se utilizaron ratas macho de la variedad Long-Evans provenientes de la colonia del Servei Central de Support a la Investigació Experimental de la Universitat de València (Estudios capítulos 1, 2 y 4) y ratas macho de la variedad *hooded* PVG provenientes de la colonia del Departamento de Psicología de la University of Canterbury, Christchurch, Nueva Zelanda (Estudios capítulo 3). Asimismo se utilizaron ratones macho OF-1 procedentes de la empresa Charles Rivers, Barcelona (Estudios capítulo 4).

Antes de la realización de cualquier procedimiento experimental se permitió a los animales al menos una semana de aclimatación en el animalario. Todos los grupos fueron mantenidos en un ciclo de luz inverso (luces encendidas a las 21:00) bajo condiciones estándar de humedad y temperatura. Los animales fueron habituados a la manipulación por parte de los experimentadores antes de comenzar los experimentos. Las ratas fueron estabuladas en grupos de hasta 4 sujetos, excepto las que fueron utilizadas en los experimentos de autoadministración, que fueron estabuladas individualmente tras la cirugía. Los ratones fueron estabulados en cajas en grupos de 4 individuos.

Se permitió a los animales acceso *ad libitum* a agua y a pienso (Rodent Chow, Harlan) con excepción de los animales utilizados en procedimientos de autoadministración a los que se les restringió el consumo de alimento a 20 g diarios para optimizar la motivación durante las sesiones. Los animales recibieron su ración de comida tras la realización de la sesión experimental.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directivas europeas para la experimentación animal (86/609/ECC) y fueron aprobados por el Comité Ético de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València (Estudios capítulo 1, 2 y 4) y por el Comité Ético de la University of Canterbury (Estudios capítulo 3).

2.-TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Los tratamientos administrados para la realización de los diferentes experimentos fueron:

- *Cocaína* (Clorhidrato de Cocaína) procedente de Alcaliber SL, Madrid, España.
- *Sulfato de anfetamina* procedente de Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.
- *Metanfetamina* (METH) obtenida en BDG Synthesis, Wellington, Nueva Zelanda.
- Los *análogos de la benzotropina*, AHN-1055 y JHW-007, se sintetizaron como se describe en los trabajos de los grupos de Jonathan L. Katz y Amy H. Newman del National Institute of Drug Abuse (NIDA) (Agoston *et al*, 1997) por el Dr. Juan Murga en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universitat Jaume I de Castellón.
- Los *agonistas TAAR-1*; agonista selectivo RO5166017, agonista parcial RO5203648 y agonista completo RO5256390 fueron facilitados por Hoffmann-La Roche Ltd. (Basilea, Suiza).

Todos los compuestos fueron disueltos mediante ultrasonidos en cloruro sódico al 0.9%, con la ayuda de dimetilsulfóxido (DMSO al 5%) en el caso de los agonistas TAAR-1, preparados para el mismo día de su utilización durante los experimentos.

3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

La actividad locomotora es un modelo experimental relativamente fácil de reproducir, por lo que ha sido utilizado frecuentemente con el objetivo de estudiar los efectos estimulantes de diferentes compuestos. Aunque la actividad locomotora no está directamente relacionada con las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, éstas ejercen dichos efectos fundamentalmente a través de la activación de sistemas cerebrales dopaminérgicos en áreas específicas del cerebro (Zahm, 1999) asociados con la actividad exploratoria o locomotora.

En nuestros experimentos la actividad locomotora fue medida en campos abiertos mediante un sistema de video seguimiento y un programa de análisis de imagen (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France) a través del cual se obtuvieron medidas acumuladas de la trayectoria recorrida por cada animal (cm)

en intervalos de 10 minutos. El campo abierto consistió en una caja abierta de Plexiglas® negro de 50x50x35 cm. De cuatro a ocho animales fueron testados simultáneamente en campos abiertos independientes. Los animales fueron habituados al espacio durante dos sesiones consecutivas de 1 hora antes de la administración de los tratamientos.

3.1. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el AHN-1055 y de su interacción con la cocaína (ver Capítulo 1)

Para testar los efectos estimulantes del AHN-1055 sobre la actividad locomotora, los animales recibieron diferentes dosis del análogo (0, 1, 3 y 10 mg/kg intraperitoneal; i.p.) y fueron inmediatamente colocados en el campo abierto. La selección de dosis fue realizada basándonos en estudios piloto realizados en nuestro laboratorio. La actividad locomotora de los sujetos fue registrada durante 2 horas. En los estudios de interacción, las ratas recibieron el AHN-1055 como pretratamiento a diferentes dosis (0, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) y fueron colocadas en el campo abierto tras recibir un *challenge* de cocaína (15 mg/kg i.p.). La administración del análogo se realizó 1 hora antes de la de cocaína basándonos la larga duración de sus efectos evidenciados en estudios piloto realizados en nuestro laboratorio y sobre sus efectos sobre los niveles de DA extracelular en el estriado (Raje *et al*, 2005).

Con el objetivo de estudiar los efectos de la administración repetida del análogo se repitió el procedimiento descrito anteriormente durante 7 días consecutivos en ambos grupos de ratas y, tras una semana sin recibir tratamiento, fueron testados nuevamente (el día 14) administrándoles un *challenge* con la misma dosis recibida durante los primeros 7 días. Se registró la conducta de los animales durante los días 1, 7 y 14.

3.2. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el JHW-007 y de su interacción con la metanfetamina (ver Capítulo 3)

Con el objetivo de estudiar las propiedades estimulantes del JHW 007, diferentes dosis del análogo (0, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) fueron administradas en

combinación con varias dosis de metanfetamina (0, 0.25, 0.75 mg/kg, i.p.). Inmediatamente después de la administración de los tratamientos los animales fueron colocados en los campos abiertos. Las dosis de JHW-007 y los tiempos de administración del compuesto seleccionaron en base a estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y funcionales previos (Desai *et al*, 2005a; Rajé *et al*, 2003; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a) en los que se muestra, por una parte, que el análogo atraviesa muy rápidamente la barrera hematoencefálica, alcanzando una concentración máxima en el cerebro a los 60 minutos y manteniéndose de forma activa en el cerebro de forma prolongada (vida media: 5-6 horas). Además, la dosis de 10 mg/kg i.p. se ha mostrado eficaz en el bloqueo de distintos efectos funcionales de la cocaína en ratón como la estimulación locomotora y el condicionamiento de preferencia de lugar (Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a).

La actividad de los animales fue monitorizada una vez al día durante 7-8 días consecutivos. El protocolo experimental consistió en la administración del análogo JHW-007 1 hora antes que la administración de la metanfetamina. El registro de la actividad locomotora comenzó inmediatamente después de que el animal recibiera el análogo y finalizó 4 horas después de la administración de la droga.

3.3. Estudio de la estimulación locomotora inducida por el agonista R05106017 y de su interacción con la cocaína (ver Capítulo 4a).

Para el estudio de la actividad locomotora inducida por el agonista selectivo R05106017 y de sus interacciones con cocaína se registró la actividad de los animales en los aparatos de CPP durante las sesiones de condicionamiento (ver apartado 6, CPP).

3.4. Estudio de la estimulación locomotora inducida agonista parcial R05203648, del agonista completo R05256390 y de su interacción con la metanfetamina (ver Capítulo 4b)

En el caso del estudio de la estimulación locomotora inducida por los agonistas TAAR1 parcial y completo R05203648 y R05256390, respectivamente y

de las interacciones con METH, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente en el apartado 3.1.2. Se utilizó un grupo de ratas para el estudio de cada agonista. Como tratamientos experimentales se utilizaron dosis de 0, 3 y 10 y mg/kg de cada agonista y 0, 0.25, 0.75 mg/kg, i.p. de METH. Las dosis fueron determinadas en base a estudios piloto previos en nuestro laboratorio.

4. PROCEDIMIENTOS OPERANTES

Para la adquisición de la conducta operante las ratas fueron entrenadas en cámaras operantes (Panlab S.L., Barcelona, España). Las cajas de autoadministración estaban provistas de dos palancas retráctiles, situadas a derecha e izquierda de una de las paredes de la cámara, programadas como activa o inactiva. Las cámaras operantes disponían, además, de un estímulo lumínico, de un estímulo auditivo y de un receptáculo, situado entre las dos palancas retráctiles en el que se dispensaba el agua con sacarosa. La colocación de los elementos de la caja fueron dispuestos de forma contrabalanceada en las diferentes cajas (Figura 8). La presión de la palanca activa producía la activación de un estímulo lumínico situado encima de la palanca activa durante 5 segundos y la retracción de ambas palancas durante 20 segundos (*time-out*). La presiones de la palanca inactiva se registraron pero no producían ninguna consecuencia programada. En el caso de los experimentos de autoadministración de droga, los animales se conectaron mediante un tubo de poliestireno (PE-50) a una bomba de infusión, de manera que la presión de la palanca activa producía la activación de dicha bomba y la consiguiente infusión intravenosa de la droga a los sujetos. La programación de los protocolos operantes de las cámaras se realizó utilizando el software Packwin 2.0.

Las ratas fueron entrenadas para autoadministrarse diferentes sustancias en función del objetivo del experimento a lo largo de sesiones prolongadas (de aproximadamente 8 horas), hasta que alcanzaron una ejecución consistente (los criterios se especificarán más adelante según la droga y la dosis de infusión). En ningún caso se administraron infusiones no contingentes (*priming injections*). Una vez aprendida la tarea, las ratas fueron entrenadas en diferentes programas de refuerzo en función del experimento. Los tratamientos o cambios en los programas de refuerzo se introdujeron cuando los animales habían alcanzado los criterios de

estabilidad y consistencia establecidos para cada uno de ellos.



Figura 8. Cajas de autoadministración empleadas en los diferentes experimentos descritos en esta tesis. En la imagen de la derecha se observan los diferentes elementos de los que dispone la cámara, distinguiéndose dos palancas retráctiles, un estímulo lumínico, un estímulo auditivo que se utilizaba como clave del contexto y en la parte central inferior un receptáculo en el cual era administrada la sacarosa. El animal era conectado a través de la cánula implantada quirúrgicamente, a un tubo que a su vez estaba conectado a una bomba de infusión, de manera que cuando el sujeto presionaba la palanca correcta recibía una infusión de droga. Todo el sistema estaba controlado mediante un sistema informático.

4.1. Cirugía

A las ratas participantes en los experimentos de autoadministración se les implantó quirúrgicamente un catéter intravenoso en la vena yugular derecha que, mediante un anclaje colocado en el dorso del animal, permitía la conexión con la bomba de infusión de las cajas operantes y así poder recibir infusiones de droga según los protocolos de contingencias establecidos para los distintos experimentos.

Para la implantación de los catéteres los animales fueron anestesiados con Avertin (2,2,2-tribromoetanol, 12.5 mg/ml, en 2.5% alcohol amílico terciario). El anestésico fue administrado a un volumen de 2 ml por 100 g de rata (i.p.). Los

catéteres (D/E 0.63 mm, D/I 0.30 mm, Camcaths, Cambridge, UK) fueron colocados, subcutáneamente, entre las escápulas del animal. Desde el dorso, un pedestal enroscable permitía la conexión con el tubo conectado con la bomba de infusión. Desde el pedestal de la cánula, un tubo de silicona, pasado subcutáneamente hacia la parte frontal del animal y fue insertado y anclado en la vena yugular derecha. La cirugía se realizó bajo condiciones de asepsia (Figura 9)

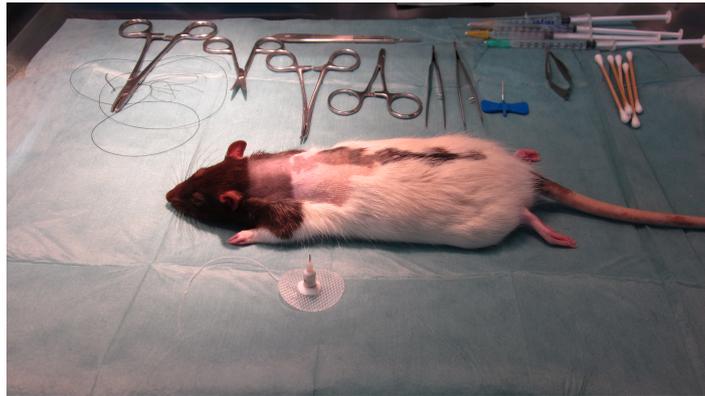


Figura 9. Condiciones y material empleado para la cirugía de implantación de la cánula.

Para prevenir infecciones los animales recibieron un tratamiento antibiótico postquirúrgico (Baytril®, 10 mg/kg, s.c., Bayer) durante 7 días. Para la prevenir la aparición de coágulos de sangre en los catéteres, se infundió a los animales suero fisiológico heparinizado (0.1 ml, 70 U.I./ml) tras la operación, tanto antes como después de cada sesión de autoadministración.

4.2. Estudios con AHN-1055 (Capítulo 1-Estudio 2)

4.2.1. Estudios de consumo

Con el objetivo de estudiar el efecto del AHN-1055 en el patrón de consumo, las ratas fueron entrenadas en las cámaras operantes para la obtención de infusiones de cocaína (0.5 mg/kg por infusión en 100 μ l/5 s), AHN-1055 (0.4 o 0.5 mg/kg por infusión en 100 μ l/5 s) o refuerzos de sacarosa (100 μ l de sacarosa al 10% dispensada) durante sesiones prologadas (de 8 horas aproximadamente) hasta que alcanzaron un consumo consistente en la sesión (50 infusiones de cocaína/AHN-1055 o 125 refuerzos de sacarosa). No se administraron inyecciones

no contingentes de droga durante el procedimiento. A continuación, las ratas fueron entrenadas en un programa de refuerzo FR1 durante sesiones diarias de 2 horas. Cuando las ratas alcanzaron un patrón de consumo consistente y estable se iniciaron los test de consumo. Se estableció como criterio de consistencia y estabilidad la realización de al menos 6 sesiones de 2 horas en las que los animales alcanzaran al menos 15 infusiones por sesión, con una variación intersesión (en las 3 últimas sesiones) no superior al 20%. Para la realización de los test de consumo las ratas recibieron inyecciones del análogo (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) 1 hora antes de cada sesión. Para la caracterización del análogo, se incorporó, además, un grupo adicional de ratas que fue entrenada para la obtención de AHN-1055 (0.5 mg/kg por infusión en 100 µl).

Para testar la influencia del tratamiento de AHN-1055 en el consumo de sacarosa las ratas fueron entrenadas asimismo en sesiones diarias de 1 hora en un programa de refuerzo FR1 para la obtención de sacarosa hasta que alcanzaron el criterio de consistencia y estabilidad, establecido en 3 sesiones consecutivas con una variación de respuesta intersesión menor al 20%. En las subsecuentes dos sesiones las ratas recibieron AHN-1055 (10 mg/kg) o salino de forma contrabalanceada 1 hora antes de la correspondiente sesión de autoadministración.

4.2.2. Test de recaída inducida por contexto

Tras los test de consumo con AHN-1055, se mantuvo a las ratas en abstinencia forzada durante 2 semanas y para ser posteriormente testadas en un test de búsqueda activa de droga (test de recaída inducida por contexto). Para la realización de este test el animal fue reintroducido en la cámara operante en la que experimentó el consumo activo de droga durante el entrenamiento (teniendo ésta las palancas accesibles pero sin contingencias programadas y, por lo tanto, sin droga disponible) y se mide la intensidad en la respuesta de búsqueda de consumo de droga. Esta variable es operacionalizada considerando el número de respuestas realizadas en la palanca activa durante la sesión.

4.2.3. Estudios de Razón Progresiva

Con el objetivo de estudiar las propiedades motivacionales de la cocaína y del AHN-1055 y su eficacia reforzante, se entrenó a las ratas en un programa de refuerzo FR1, de la misma forma que en lo descrito para el estudio de consumo del apartado anterior. Una vez que los animales alcanzaron el criterio de estabilidad y consistencia se cambió el programa de refuerzo en las sesiones subsiguientes, aumentándose progresivamente el requerimiento para la obtención de droga. Así pues, tras el entrenamiento en FR1 el programa de razón fijo se fue aumentando para cada 3 sesiones consecutivas siguiendo la siguiente progresión: FR3, FR9, FR18, FR27. El experimento se finalizó en el momento en el que alguno de los dos grupos experimentales alcanzó una cantidad de refuerzos <10% respecto al número de refuerzos obtenidos en las 3 últimas sesiones del entrenamiento en FR1.

La elección de un protocolo de razón progresivo (PR) intersesión frente a los más comúnmente utilizados del tipo intrasesión (aumento progresivo del requerimiento para la obtención del refuerzo dentro de una misma sesión), se realizó para tratar de evitar la interferencia de los efectos acumulados de las drogas en una sola sesión (Richardson and Roberts, 1996). La dosis de AHN-1055 por infusión se rebajó ligeramente en este estudio respecto a la del consumo (a 0.4 mg/kg por infusión en 100 μ l) con la finalidad de ajustar la tasa de respuesta por sesión todavía más a la obtenida con la cocaína.

Adicionalmente se incorporó otro grupo de animales que se entrenó para la autoadministración de dosis más altas de AHN-1055 (1.2 mg/kg por infusión en 166 μ l /10 s). El volumen por infusión se aumentó en este grupo para permitir la correcta disolución del compuesto.

4.3. Estudio de sustitución con AHN-1055 (Capítulo 2-Estudio 1)

4.3.1. Procedimiento de entrenamiento y sustitución

Los animales fueron entrenados bajo un programa de refuerzo FR1 durante sesiones prolongadas (de aprox. 8 horas) hasta que alcanzaron el criterio de 50 refuerzos de cocaína por sesión. A partir de este momento los animales realizaron sesiones diarias de 1 hora de duración hasta que mantuvieron el criterio de

estabilidad establecido que consistió en haber recibido al menos 10 infusiones de droga durante un mínimo de 10 sesiones con una variabilidad menor del 20% en las tres últimas. Durante las sesiones de entrenamiento las ratas no recibieron ninguna inyección de droga por parte del experimentador. Una vez alcanzado el criterio de estabilidad, la cocaína fue sustituida de manera aleatoria en cada uno de los grupos experimentales por: salino (CO-SAL), amfetamina (0.1 mg/kg/infusión; CO-AMPH) y AHN-1055 (0.50 mg/kg/infusión; CO-AHN_0.5 o 0.17 mg/kg/infusión; CO-AHN_0.17). Tras las sesiones en las que los animales habían recibido la sustancia sustitutiva, todos los grupos, excepto el que sustituyó por amfetamina, fueron divididos en dos con el objetivo de poder realizar el test de recaída bajo el efecto de cocaína y solución salina. Como control de las condiciones experimentales se añadió un grupo adicional sin ninguna experiencia con la droga, (SAL-SAL), que recibió solución salina tanto en las sesiones de entrenamiento como en las de sustitución y que también fue también dividido en dos para la realización del test de recaída. Las sesiones de sustitución se mantuvieron bajo condiciones experimentales idénticas a las de las sesiones de entrenamiento exceptuando la droga sustituida. La infusión de droga fue acompañada por la activación simultánea de un estímulo lumínico y de la retracción de ambas palancas durante 20 segundos (*time out*). Para poder dissociar en el test de recaída los efectos farmacológicos *per se* del tratamiento con el análogo AHN-1055 (tratamiento pasivo) y los efectos inducidos por el consumo activo del tratamiento sustitutivo con el consiguiente cese de consumo voluntario, incluimos otro grupo experimental (CO-AHN_yoked). Cada animal de este grupo fue apareado con otro animal del grupo CO-AHN_0.5, de forma que los animales recibieran las mismas infusiones del análogo pero de forma pasiva. Las ratas *yoked* realizaron las sesiones de sustitución en las mismas condiciones que sus ratas asociadas del grupo de tratamiento de sustitución consumido voluntariamente con las palancas retraídas y el estímulo lumínico inactivado. Los animales realizaron un total de 18 sesiones de sustitución antes de ser sometidos a los test de recaída.

4.3.2. Test de recaída inducida por droga

Tras el procedimiento de sustitución, se indujo el restablecimiento de la búsqueda de cocaína de los animales administrándoles un *challenge* de cocaína (10

mg/kg), o bien solución salina i.p. como control, 10 minutos antes de la realización de la sesión de test en las cámaras operantes. El comportamiento de búsqueda de droga se midió registrando el número de veces que los animales presionaron la palanca activa. Para evitar una posible influencia de los estímulos condicionados durante los tests, tanto el estímulo lumínico como la bomba de infusión fueron desconectados durante el mismo, de forma que la activación de cualquiera de las dos palancas no producía ninguna consecuencia programada. Una de las ratas del grupo CO-AHN-1055 (0.50 mg/kg/infusión) completó las sesiones de sustitución pero murió antes de la realización de los test de recaída. Los datos de este animal fueron incluidos hasta este punto.

4.4. Estudios con JHW-007 (Capítulo 3-Estudio 2)

4.4.1. Estudio de consumo

Con el objetivo de estudiar la adquisición de la conducta de autoadministración, varios grupos de ratas fueron entrenados para recibir infusiones de diferentes dosis de metanfetamina: METH 0.04 (0.04 mg/kg in 50 μ l/3 s; n= 7), METH 0.12 (0.12 mg/kg in 150 μ l/9 s; n=7) y 0 METH (solución salina en 50 μ l/3 s; n=5) o refuerzos de sacarosa (100 μ l 10% sacarosa administrado en 5 gotas; n=7). En este experimento, la presión sobre la palanca activa producía la activación del estímulo lumínico durante 5 segundos y la retracción de ambas palancas durante un periodo de 20 segundos (*time-out*). Inicialmente los animales fueron entrenados en sesiones de larga duración (aprox. 8 horas), hasta que alcanzaron los criterios de estabilidad establecidos para el experimento. Estos criterios fueron al menos 17 infusiones para el grupo 0.12 mg/kg de METH, 50 infusiones para el grupo de 0.04 mg/kg de METH y 125 refuerzos para el grupo que recibía sacarosa. Cuando los animales manifestaron consistencia en la conducta operante aprendida, pasaron a ser entrenados bajo un programa de refuerzo de razón fija (FR3) durante 1 hora diaria hasta que alcanzaron un criterio de estabilidad establecido como: realización de un mínimo de 6 sesiones de 1 hora en las que el consumo fuera ≥ 1 mg/kg de METH u obtuvieran ≥ 100 refuerzos de sacarosa, siendo la variabilidad intersesión en las tres últimas sesiones $\geq 20\%$). Una vez alcanzado dicho criterio, las ratas fueron

sometidas a un test de consumo y de PR en orden contrabalanceado. Después de la realización del primer test (de consumo o de PR), los sujetos debían realizar nuevamente tres sesiones estables consecutivas para ser testadas de nuevo.

4.4.2. Test de consumo

Los test de consumo consistieron en tres sesiones realizadas en días consecutivos, similares a las sesiones de entrenamiento, en las que los animales recibieron como pretratamiento diferentes dosis del análogo JHW 007 (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) 1 hora antes de comenzar la sesión de autoadministración. Las diferentes dosis de JHW 007 fueron administradas de manera contrabalanceada entre los distintos animales del mismo grupo experimental.

4.4.3. Test de Razón Progresiva

El test de PR se realizó con el objetivo de estudiar el efecto que ejerce el JHW 007 sobre la eficacia reforzante tanto de la METH como de un reforzador natural como es la sacarosa. Los animales completaron 3 sesiones de SA de 8 horas de duración bajo un programa de refuerzo de PR en el que el requerimiento para la obtención de cada refuerzo se fue incrementando progresivamente según la siguiente secuencia numérica: 3, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, etc. derivada de la ecuación $[5e^{(\text{número inyección} \times 0.2)}] - 5$ (Richardson *et al*, 1996). Antes de cada sesión de autoadministración, los animales recibieron como pretratamiento diferentes dosis del análogo JHW 007 (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) 1 hora antes de comenzar la sesión de autoadministración. Se consideró como la medida de la eficacia reforzante de la droga el último ratio alcanzado o *breaking point* bajo la influencia de cada uno de los tratamientos.

4.5. Estudios con agonistas TAAR1 (Capítulo 4-Estudios 1 y 3)

4.5.1. Estudio de la influencia del aagonista parcial R05203648 en el consumo de cocaína.

Con el objetivo de estudiar la influencia de la activación parcial de los receptores TAAR1 en la autoadministración de cocaína, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.2.1 exceptuando el hecho de que de que el

tratamiento con el R05203648 a las dosis de 0, 3 y 10 mg/kg, se administró 30 minutos antes de comenzar las sesiones de autoadministración durante los test.

4.5.2. Estudio de la influencia de los agonistas parcial y completo, R05203648 y R05256390, respectivamente, en el consumo de sacarosa.

Para estudiar la influencia del agonismo TAAR1 en la conducta operante por un refuerzo natural y de su eficacia reforzante se entrenó a dos grupos de ratas en la adquisición de la conducta de autoadministración de sacarosa según el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 5.4. Ambos grupos de ratas fueron testados en test de consumo y test de PR (apartados 5.4.2 y 5.4.3 respectivamente). Los tratamientos farmacológicos administrados fueron de 0, 3 y 10 mg/kg i.p., en ambos casos, administrados 10 minutos antes de comenzar cada sesión de test.

5. PREFERENCIA DE LUGAR CONDICIONADA (Capítulo 4)

5.1 Preferencia de lugar condicionada inducida por el R05106017 y su interacción con cocaína

El condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) es un modelo de comportamiento estándar ampliamente utilizado para la caracterización preclínica de las propiedades recompensantes y/o aversivas de fármacos o drogas.

El procedimiento de CPP se realizó en cajas de metacrilato forrado de vinilo negro, consistentes en dos habitáculos con diferentes patrones visuales en paredes (rayado o lunares blancos sobre fondo negro) y diferente patrón táctil en los enrejados metálicos de los suelos para facilitar la discriminación por parte de los animales. Los dos habitáculos (20x18x25 cm) estaban interconectados por un pasillo exterior con paredes transparentes y suelo de Perspex® negro. Sendas guillotinas bloqueaban el acceso al pasillo y permitía el confinamiento de los animales en los respectivos habitáculos durante las sesiones de condicionamiento (Figura 10). La posición y movimiento de los animales en el aparato de CPP se realizó mediante un software de vídeoseguimiento (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France).

El protocolo experimental consistió en tres fases: precondicionamiento,

condicionamiento y postcondicionamiento (test). Durante el preconditionamiento los animales fueron habituados al aparato de CPP durante 15 minutos en 2 días consecutivos. La preferencia mostrada en el segundo día de preconditionamiento fue considerada como la “preferencia basal”. Durante la fase de condicionamiento (8 días consecutivos) se alternaron sesiones de condicionamiento con droga y sesiones en las que se administraba vehículo. En estas sesiones se administraba la droga o el vehículo (i.p.) y se confinaba a los animales en su compartimento asociado. En la fase de test los animales, libres de droga, fueron colocados en el aparato de CPP permitiéndoseles la libre exploración de ambos compartimentos durante 15 minutos. Se consideró el porcentaje de tiempo en el compartimento asociado a la droga respecto al total (en ambos compartimentos, excluyendo el pasillo) como la medida de preferencia de lugar.

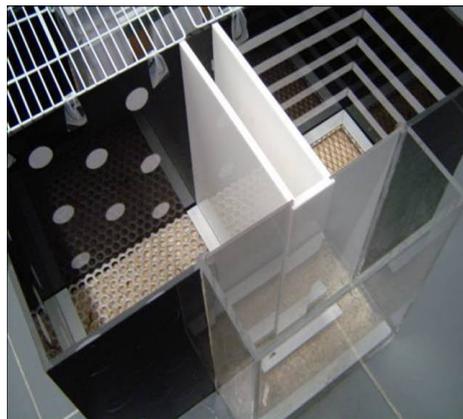


Figura 10. Aparato de CPP empleado en los experimentos. En la imagen se aprecian los dos compartimentos estancos en los que se lleva a cabo el condicionamiento de los animales, bien con drogas o con vehículo. Uno de ellos está formado por paredes negras con círculos blancos y una reja gruesa en el suelo también con círculos y el otro presenta paredes negras con rayas blancas y un suelo de alambre más fino a modo de rombos. Ambos pasillos se encuentran conectados por un pasillo central que presenta paredes transparentes y un suelo liso de metacrilato.

6. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS (WESTERN BLOTTING)

Tras la realización de los test de recaída las ratas fueron estabuladas en sus cajas habituales durante 30 minutos, período tras el cual fueron sacrificadas por decapitación bajo anestesia. Los cerebros fueron inmediatamente extraídos, colocados en una matriz cerebral y cortados en rodajas coronales de 1mm de grosor. Las rodajas bañadas ligeramente con tampón fosfato se colocaron en una placa petri colocada sobre hielo. Se recogieron muestras del cortex prefrontal medial (mPrC) concretamente de las áreas prelímbica y anterior del cortex cingulado (PrLC y Cg1). Las muestras cerebrales fueron obtenidas mediante un perforador cerebral de 1 mm de diámetro y fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido para ser posteriormente almacenadas a -80 °C hasta la realización de los análisis de proteínas. Antes de la homogeneización, se juntó el tejido cerebral de las ratas pertenecientes al mismo grupo experimental (n=5-7) obteniendo una cantidad de tejido que oscilaba entre 0.61 ± 0.23 mg/muestra. Las muestras fueron homogeneizadas mediante ultrasonidos (2 X 5 s, 40W; Sonicador Branson 250) en 300 μ l de tampón de lisis frío compuesto por 50 mM HCl (pH 6.8), 2% SDS, 1 mM EDTA, 1% de EDTA, 1% de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich), y 1% de cóctel inhibidor de fosfatasas (Sigma-Aldrich). La concentración total de proteínas de las muestras de tejido cerebral fue determinado mediante el método del ácido bicinónico (BCA) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Se mezclaron volúmenes equivalentes (1:1) de tampón de carga, conteniendo 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20 % glicerol, 3% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 1% azul de bromofenol con los homogenados de tejido cerebral. Finalmente las muestras fueron hervidas durante 4 minutos, distribuidas en alícuotas de trabajo y almacenadas a -20 °C para su uso posterior. La cuantificación de proteínas se realizó según el procedimiento estándar (Garcia-Fuster *et al*, 2007). Se cargaron 15 μ g de proteína alicuotada procedente de cada grupo experimental en minigeles al 12% SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para ser transferidas eléctricamente a membranas porosas (0.45 mm/poro) de nitrocelulosa (Whatman International Ltd., Dassel, Alemania). Tras la incubación en una solución de bloqueo (5% BSA y 1% Tween-20) las

membranas fueron expuestas al anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en agitación. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-c-Fos (sc-253, lote D012, 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-BDNF (sc-546, lote J1110, 1:700, Santa Cruz Biotechnology), anti-FADD (sc-5559, lote K1404, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology), y anti-p-Ser191 FADD (Ab 2785, lote 1, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). El anticuerpo primario de BDNF detecta la forma madura e inmadura de la proteína (28 kDa y 13 kDa, respectivamente). El total de FADD y de p-FADD detectado correspondió a las especies diméricas (51 kDa) u oligoméricas (116 kDa). A continuación, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo y posteriormente fueron tratadas con el anticuerpo secundario correspondiente, bien anti-rabbit o anti-mouse (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1:5000). Se detectó la inmunoreactividad de las proteínas diana mediante un sistema de detección de quimioluminiscente (ECL) (Amersham International, Buckinghamshire, UK) y se visualizó mediante su exposición a autoradiogramas Hyperfilm ECL (Amersham) durante 1-60 minutos. Como control de carga y transferencia de las proteínas, las membranas fueron lavadas e incubadas de nuevo con el anticuerpo contra β -actina (clone AC-15, 1:10000, Sigma-Aldrich) (Boronat et al. 2001). Se realizó una cuantificación fotodensitométrica de las bandas mediante un analizador de imagen, obteniendo valores de densidad óptica para cada una de las muestras (GS-800 Imaging Densitometer, Bio-Rad). Las medidas de inmunoreactividad de los anticuerpos primarios fueron normalizadas con las medidas que se obtuvieron con los mismos geles tras ser testadas de nuevo con anticuerpo contra β -actina. La cantidad de proteínas en el mPFC de los grupos experimentales fue comparada con los animales control (grupo SAL-SAL-SAL) en el mismo gel. Los experimentos se realizaron utilizando cantidades conocidas de proteínas dentro del rango lineal de inmunodetección para cada proteína de interés. Las medias y los errores estándar estimados finales se obtuvieron de las réplicas (al menos 3) del procedimiento de cuantificación.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos comportamentales fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de comparaciones *post-hoc*, cuando fue requerido, con el método de Newman-Keuls. Se usó el error muestral del análisis de varianza como denominador. La significación estadística fue establecida en $\alpha=0.05$ para cada experimento. Para la realización de los análisis estadísticos y la generación de los gráficos se utilizó el software estadístico Statview 5.0.

Debido a la limitada disponibilidad de tejido cerebral recogido, las muestras pertenecientes al mismo grupo experimental fueron analizadas como un conjunto. Los datos neuroquímicos obtenidos de las medidas repetidas del mismo grupo experimental, fueron examinados mediante un análisis de varianza ANOVA de dos vías con dos factores (Lew, 2007). En este caso la significación estadística fue establecida en $\alpha=0.02$ ($\alpha=0.05$ dividido por $n-1$ réplicas).

RESULTADOS

Capítulo 1: Estudio sobre el potencial de abuso del inhibidor del transportador de dopamina AHN-1055 y de su influencia en el consumo de cocaína.

La mayor parte de este estudio ha sido publicado en *Psychopharmacology* (Berl). 2009 Dec;207(2):281-9. Epub 2009 Sep 16. Ver Anexo I.

INTRODUCCIÓN

La cocaína es un inhibidor de la recaptación de monoaminas con conocidos efectos estimulantes y es considerada una de las drogas recreativas más adictivas en humanos. Como consecuencia del abuso de cocaína puede producirse un trastorno psiquiátrico caracterizado por la pérdida de control sobre el consumo de la droga y por altas tasas de recaída tras un periodo de abstinencia o de detoxificación. Se han utilizado diferentes aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de este trastorno, siendo las más relevantes el uso de agonistas dopaminérgicos y de drogas anticonvulsivas (Karila *et al*, 2008; Minozzi *et al*, 2008; Sofuoglu and Kosten, 2005). Asimismo, otras estrategias terapéuticas están en avanzado estado de desarrollo y evaluación, como es el caso del uso de vacunas anti-cocaína (Orson *et al*, 2008). A pesar de ello, hasta la fecha no existen medicaciones disponibles que con eficacia terapéutica demostrada para el tratamiento de el abuso de cocaína. Así pues, la gravedad de la problemática asociada y lo extendido de su uso en nuestra sociedad hacen de la búsqueda de nuevos agentes que faciliten la detoxificación de la cocaína y que prevengan la recaída de su uso un área de investigación de gran interés.

Uno de las aproximaciones más importantes para el tratamiento de la adicción a la cocaína es el estudio y desarrollo de agentes farmacológicos que interactúen con el transportador de dopamina, de forma que impidan a la cocaína unirse a su diana biológica más importante (Dutta *et al*, 2003; Katz *et al*, 1997). Se han estudiado hasta la fecha diferentes compuestos que interactúan con el DAT. Entre ellos se incluyen la benzotropina, el mazindol, el metilfenidato y los análogos de la fenilciclina. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos muestran un marcado perfil psicoestimulante, característica que típicamente está relacionada con un elevado potencial de abuso. Algunos estudios moleculares y correlacionales

han mostrado recientemente que las diferencias en las propiedades psicoestimulantes de la cocaína, de la benzotropina y de otros inhibidores de la recaptura de dopamina con baja eficacia reforzante podrían ser debidos a diferentes modos de interacción con el DAT, que producirían diferentes cambios conformacionales en el mismo (Chen and Reith, 2004a, 2007; Dar *et al*, 2005; Loland *et al*, 2008; Ukairo *et al*, 2005; Vaughan *et al*, 1999). La identificación de los mecanismos moleculares específicos a través de los cuales se produce esta interacción podría ayudar al diseño racional de farmacoterapias efectivas para el tratamiento la adicción a la cocaína.

El desarrollo de un hipotético tratamiento sustitutivo para la adicción a la cocaína, que ha sido implementado con éxito en el tratamiento de la dependencia a nicotina (Stead *et al*, 2008) y opioides (Davids and Gastpar, 2004; Uchtenhagen, 2003), requeriría del desarrollo de ligandos del DAT que mostraran una acción prolongada y que, además, mostraran un perfil psicoestimulante bajo y reducidos o nulos efectos reforzantes. En línea con esta idea, se han desarrollado en los últimos años una serie de inhibidores del DAT originados a partir de sustituciones del grupo N del anillo tropano de la molécula de benzotropina que muestran perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos consistentes con las características ideales de una hipotética medicación para el tratamiento de la adicción a la cocaína (Katz *et al*, 2001; Katz *et al*, 2004; Newman and Agoston, 1998). Estos compuestos muestran una alta afinidad por el DAT pero no por el NET ni SERT y muestran, asimismo, una tasa de ocupación del DAT más lenta que la de la cocaína (Desai *et al*, 2005a; Desai *et al*, 2005b; Katz *et al*, 2004). Además, estos compuestos producen un incremento lento y sostenido de la transmisión dopaminérgica, a diferencia de las elevadas y rápidas elevaciones de la transmisión que produce la cocaína (Raje *et al*, 2005). En los estudios que se describen a continuación caracterizamos la eficacia estimulante y reforzante del 3(α)-[bis(4'-fluorofenil)metoxi]-tropano (AHN-1055), un análogo de la benzotropina con una alta afinidad por el DAT (K_i = 11.8 nM), pero no para el NET (K_i = 610 nM) ni el SERT (K_i = 3260 nM). Esta molécula también muestra cierto antagonismo de los receptores M_1 (K_i = 11.6 nM). El perfil farmacológico del AHN-1055 difiere en gran medida al de la cocaína, uniéndose a los mismos transportadores y receptores a concentraciones de 187, 3210, 172, y 61400 nM, respectivamente (Agoston *et al*,

1997; Li *et al*, 2005; Rothman *et al*, 2008a). El AHN-1055 produce en comparación con la cocaína un inicio más lento de la acción farmacológica, alcanzando mucho más tarde concentraciones máximas en dializados de cerebro (siendo el T_{max} de 10 min para la cocaína y de 2 horas para el AHN-1055) (Raje *et al*, 2005). Muestra asimismo elevaciones de la DA extracelular más prolongadas (1 hora la cocaína frente a 12-24 h del AHN-1055), y tiene una vida media más larga (1 hora la cocaína frente a varias horas del AHN-1055 (Raje *et al*, 2005). Estas propiedades neurofarmacológicas se han relacionado con sus débiles efectos estimulantes en tests de actividad locomotora y de condicionamiento de preferencia de lugar (Li *et al*, 2005). Además, las acciones antimuscarínicas del AHN-1055 podrían ser relevantes, teniendo en cuenta la implicación de los receptores muscarínicos en las acciones reforzantes y recompensantes de las drogas (Carrigan and Dykstra, 2007; Crespo *et al*, 2006). En definitiva, por las características particulares de dicho análogo y por su potencial para el desarrollo de herramientas terapéuticas para el tratamiento del abuso de cocaína, el propósito de esta serie de experimentos fue la caracterización y estudio de las características estimulantes de este análogo y de su combinación con cocaína, de su potencial de abuso y de sus efectos en el consumo de cocaína.

PLAN EXPERIMENTAL

Estudio 1. Estudios de locomoción y análisis de conducta estereotipada inducidos por el AHN-1055 y de su interacción con cocaína.

(Descrito en la sección 3.1.1. del apartado de Material y Métodos)

Para el estudio de las propiedades estimulantes de los análogos se administraron diferentes dosis del análogo (0, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) y se estudió la actividad locomotora de los animales (N=5-6 por dosis) en campos abiertos en tests de 2 horas. Los tratamientos se repitieron durante 7 días consecutivos. Tras una semana sin recibir tratamientos los animales recibieron nuevamente la administración del análogo.

Para el estudio de la interacción entre el AHN-1055 y la cocaína se administraron pretratamientos con el análogo (vehículo, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) y se

registró la actividad locomotora 2 horas después, tras la administración de un *challenge* de cocaína (vehículo o 15 mg/kg i.p.) en un grupo diferente de ratas (N=7-8). Los tratamientos se repitieron durante 7 días consecutivos. Tras una semana sin recibir tratamiento alguno los animales recibieron un *challenge* de cocaína (15 mg/kg i.p.). Se realizaron mediciones de la estereotipia motora en los días 1, 7 y 14 del procedimiento experimental.

Estudio 2: Estudio de la motivación para la obtención de AHN-1055 en comparación con la cocaína mediante un programa modificado de razón progresiva.

(Descrito en la sección 5.2.3. del apartado de Material y Métodos)

Con el objetivo de estudiar la motivación de los animales para la obtención de ambas sustancias, 3 grupos diferentes de ratas (se utilizaron 2 dosis diferentes de AHN1-055: 0.4 y 1.2 mg/kg/infusión; n=6-7 grupo) fueron testados en diferentes sesiones de SA en las que el requerimiento necesario para la obtención de cada infusión fue aumentando de sesión en sesión (programa de razón progresiva intersesión).

Estudio 3. Efectos del AHN-1055 sobre el consumo de cocaína y sacarosa.

(Descrito en sección 5.2 del apartado de Material y Métodos)

Se estudiaron los efectos de diferentes dosis de AHN-1055 (i.p.) como tratamiento 1 h antes del comienzo de las sesiones diarias de consumo (SA) de cocaína (n=6-7 grupo) o sacarosa (n= 10) como control de especificidad.

Estudio 4: Estudio de recaída en la búsqueda de droga inducido por contexto tras un período de abstinencia forzada.

(Descrito en la sección 5.2.2. del apartado de Material y Métodos)

Se comparó el nivel de búsqueda de droga en los animales consumidores de cocaína en el Estudio 3 en un paradigma de recaída inducido por contexto tras dos

semanas de abstinencia forzada con un grupo de animales entrenado para la autoadministración de AHN-1055 (con un historial de consumo semejante).

RESULTADOS

Estudio 1. Efectos estimulantes del AHN-1055 en agudo, su combinación con cocaína y de su administración repetida.

Para estudiar los efectos de un tratamiento de AHN-1055 en la actividad locomotora, las ratas recibieron un rango de dosis relevantes y fueron colocadas en el campo abierto para su estudio. Se realizó un ANOVA con una factor entre sujetos "Tratamiento" (0, 1, 3, 10 mg/kg de AHN-1055), y un factor intrasujetos "Tiempo" (intervalos de tiempo de 5 min a lo largo del tiempo de sesión). Los resultados revelaron un efecto significativo del factor Tratamiento [$F_{(3,345)} = 9.473$, $p < 0.001$]. La interacción Tratamiento x Tiempo no fue significativa. Comparaciones *post hoc* revelaron que el AHN-1055 incrementó significativamente la actividad locomotora en su dosis más alta comparado con los valores control ($p < 0.01$ con N-K test). Los efectos estimulantes del AHN-1055 fueron dependientes de la dosis y sostenidos a lo largo de las 2 horas de la sesión. (Figura 11a, 11b). A continuación examinamos la influencia del AHN-1055 en la estimulación locomotora inducida por la cocaína administrando el análogo antes del tratamiento con cocaína. Se realizó un ANOVA con un factor entre sujetos "Tratamiento" (5 grupos recibiendo salino o AHN-1055 como pretratamiento seguido de cocaína) y un Factor de medidas repetidas "Tiempo" (intervalos de 5 min a lo largo de la sesión). Los resultados mostraron un efecto significativo de la variable "Tratamiento" ($F_{4,264} = 4.580$, $p < 0.007$) y de la interacción "Tratamiento" X "Tiempo" ($F_{44,345} = 1.457$, $p < 0.039$). Todos los grupos experimentales aumentaron la actividad locomotora y difirieron significativamente de los valores basales, a pesar de que la actividad acumulada a lo largo de la sesión no difirió entre los cuatro grupos expuestos a la cocaína. Sin embargo, la exploración del efecto de interacción reveló diferencias significativas en el patrón de actividad inducido por los tratamientos. Comparaciones a posteriori de las medias (N-K) mostraron diferencias significativas entre los grupos que recibieron cocaína solo y los grupos

que recibieron la dosis alta de AHN-1055 seguida de cocaína ($p < 0.05$). El tratamiento de AHN-1055 potenció la estimulación producida por la cocaína, aparentemente con efectos aditivos en el inicio de la sesión (Figura 11c). Estos datos demuestran que el AHN-1055 posee efectos estimulantes en la actividad locomotora. Además, cuando se combinó el análogo con el tratamiento de cocaína, los efectos locomotores fueron mayores que aquellos que se observaron tanto con una u otra droga administrada separadamente.

Estudio 2. El AHN-1055 muestra una débil eficacia reforzante comparado con la cocaína en un programa de refuerzo progresivo.

Para investigar las propiedades reforzantes del AHN-1055 y compararlas con las de la propia cocaína, las ratas fueron entrenadas para la autoadministración de AHN-1055 o cocaína usando un programa de refuerzo de razón fija (FR1). Una vez las ratas adquirían consistentemente la tarea, los requerimientos para conseguir cada refuerzo se fueron aumentando a lo largo de las sesiones. Se realizó un ANOVA con un factor entre-sujetos "Tratamiento" (3 grupos recibiendo cocaína, AHN-1055 o infusiones de salino) y un factor de medidas repetidas, "Requerimiento" (con tantos niveles como sesiones por programa). Bajo las condiciones de FR1, los grupos que se administraron cocaína o el análogo obtuvieron un número similar de refuerzos comparados con los del grupo control (gráfico insertado en Figura 12a). El ANOVA mostró un efecto significativo del factor "Tratamiento" ($F_{2,55} = 45.075$, $p < 0.001$). La comparación de medias, bajo la condición de FR1, evidenció diferencias significativas entre los grupos que se administraron cocaína y AHN-1055 comparados con los que obtenían salino en cada infusión ($p < 0.01$ con tests N-K). Es importante subrayar que el patrón temporal de autoadministración difirió entre la cocaína y el AHN-1055.

Normalmente los animales que respondían por el análogo concentraban sus respuestas en la primera parte de la sesión, lo cual contrastaba con la regularidad cíclica exhibida por las ratas que recibían infusiones de cocaína (Figura 2b). En cuanto los requerimientos de la tarea se incrementaron a FR3 las respuestas por cocaína se ajustaron de forma que las ratas mantuvieron el nivel de consumo por

sesión de forma estable, mientras que no sucedió lo mismo con las ratas que respondían por AHN-1055. El ANOVA mostró un efecto significativo de la variable "Tratamiento" ($F_{2,22} = 45.075$, $p < 0.001$) y las comparaciones de medias *a posteriori* revelaron diferencias entre la cocaína y el AHN-1055 ($p < 0.01$ con N-K test). Los incrementos subsecuentes de la demanda en la tarea bajo FR9, FR18 y FR27 produjo consecuencias dramáticas en el patrón de respuesta operante para la obtención de AHN-1055, reduciéndose progresivamente y conduciendo a la extinción de la respuesta (Figura 12a). No se observó, sin embargo, ningún decremento en la tasa de respuesta en las ratas que se autoadministraban cocaína.

Estos animales adaptaron progresivamente su respuesta en cada sesión para mantener la tasa de consumo de cocaína dentro de niveles similares a pesar de los fuertes incrementos en el incremento de la tarea. El ANOVA reveló efectos significativos del factor "Tratamiento" bajo FR9 ($F_{2,22} = 23.412$, $p < 0.001$), FR18 ($F_{2,22} = 62.131$, $p < 0.001$) y FR27 ($F_{2,22} = 58.017$, $p < 0.001$). Las respuestas para la obtención de cocaína difirieron de aquellas realizadas por el grupo AHN-1055 bajo los diferentes requerimientos en la tarea ($p < 0.01$ mediante N-K tests). Estas observaciones ponen de manifiesto importantes diferencias en la motivación de los animales para la obtención de cocaína y de AHN-1055.

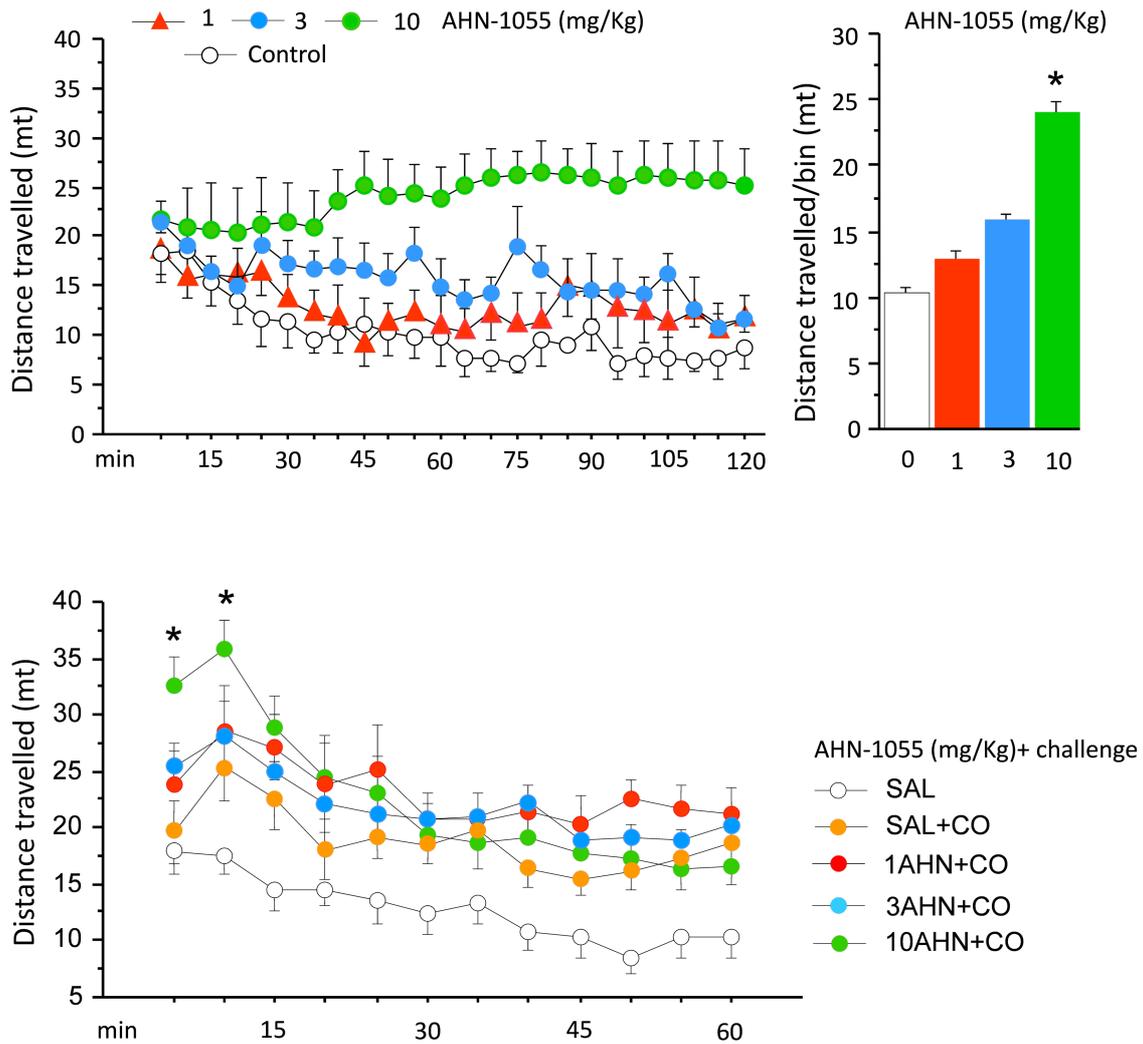


Figura 11. Efectos inducidos por el AHN-1055 en la actividad locomotora en agudo y en administración combinada con cocaína. El AHN-1055 (0, 1, 3, 10 mg/Kg) (n= 6 para los grupos experimentales; n= 5 para grupo control) indujo un efecto destacado en la actividad locomotora, provocando una estimulación sostenida bajo la dosis más alta. Los datos de la actividad locomotora a lo largo de la sesión se muestran en (a) y los valores medios por unidad de tiempo en (b). Cuando el AHN-1055 es administrado como pretratamiento, se potencia el incremento abrupto inicial en estimulación locomotora inducido por la cocaína (15 mg/Kg) (n= 8 para los grupos experimentales; n= 7 para grupo control). (*) significativamente diferente de los valores control en (b) y de los valores cocaína en (c).

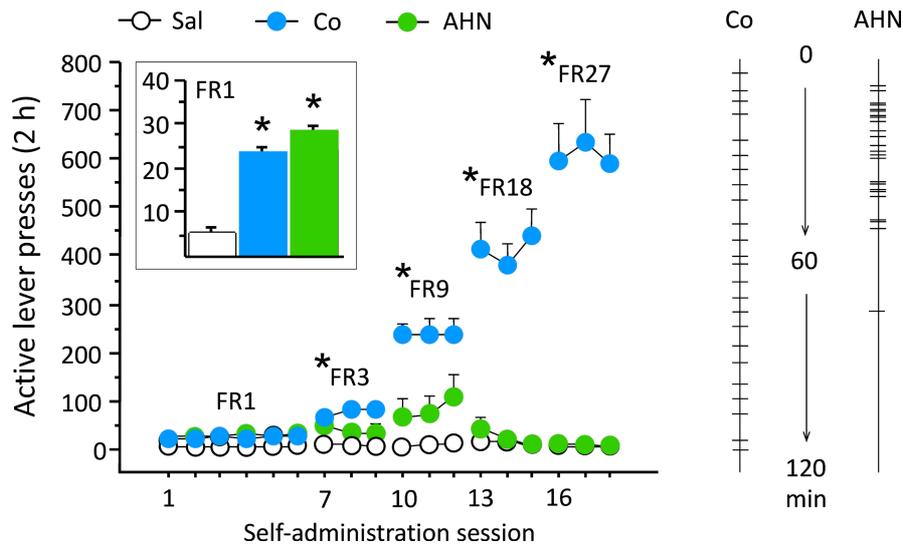


Figura 12. La cocaína y el AHN-1055 muestran efectos diferenciales en un programa de refuerzo de razón progresiva modificado. Las ratas se autoadministraron cocaína (0.5 mg/kg por infusión) o AHN-1055 (0.4 mg/kg por infusión) bajo un programa de refuerzo FR1 cuyos requerimientos en la tarea (número de palanqueos para obtener cada infusión) fueron incrementados progresivamente (n=6–7 en los grupos experimentales; n=5 en el grupo control). La gráfica insertada muestra que el nivel de respuestas para cocaína y de AHN-1055 bajo FR1 fue comparable. (a) El nivel de respuesta para la obtención del análogo comenzó a disminuir a partir del cambio a FR3, extinguiéndose a en las sesiones subsiguientes. Un grupo de ratas (n=9) fue entrenado para la autoadministración de AHN-1055 a una dosis más (1.2 mg/kg por infusión), pero ninguna de ellas alcanzaron el criterio para progresar a FR3 (datos no representados en la figura. El patrón temporal de autoadministración de cocaína y de AHN-1055 fue diferente. (b) Ejemplo representativo de respuestas en una sesión de autoadministración de cocaína o de AHN-1055. Mientras que en el primer caso las respuestas se distribuyen uniformemente a lo largo de la sesión, para el análogo las respuestas tienden a concentrarse en la primera parte de la sesión. * Significativamente diferente a los valores cocaína.

Estudio 3. El AHN bloquea de forma dosis dependiente la autoadministración de cocaína sin afectar al consumo de sacarosa.

Con el objetivo de determinar los efectos del AHN-1055 en el consumo de

cocaína, ratas con un historial previo de consumo de cocaína consistente y estable fueron tratadas con el análogo antes de las sesiones de autoadministración. Los grupos eran equivalentes en sus niveles de respuesta antes de la introducción de los tratamientos. Se realizó un ANOVA con un factor entre sujetos "Tratamiento", con cuatro grupos (0, 3 y 10 mg/kg de AHN-1055 con la autoadministración de cocaína además de un grupo control) y una variable intra-sujetos, "Sesión", con 10 niveles (tantas como sesiones de autoadministración). El ANOVA mostró un efecto principal del Tratamiento ($F_{4,225} = 23.735, p < 0.001$) y una interacción significativa Tratamiento X Sesión ($F_{36,225} = 10.719, p < 0.001$), indicando que la tasa de consumo durante los test se modificó por los tratamientos. Análisis *post-hoc* del efecto de interacción mostraron que el tratamiento de AHN-1055 redujo de manera dependiente de la dosis la respuesta por cocaína, llegando en su dosis más alta a reducir el nivel de respuesta de los animales al del grupo control, con una tasa de respuesta marginal ($p < 0.01$ mediante tests N-K) (Figura 13a). Tras los tests de consumo, los cuatro grupos de ratas usados en este experimento no realizaron ninguna sesión de autoadministración más durante un período de dos semanas (abstinencia forzada). Una vez transcurrido este período se testó a los animales en su conducta de búsqueda de droga colocándolos de nuevo en las cajas de autoadministración (*recaída inducida por contexto*). La conducta de búsqueda de droga se operacionalizó considerando el número de palanqueos en la que había sido durante las sesiones de autoadministración la palanca activa.

La disminución en el consumo de cocaína producido por el tratamiento de AHN-1055 pudo ser secundario a un déficit motor o motivacional inducido por el análogo. Para excluir este posible efecto contundente, deliberadamente seleccionamos una tarea operante que generara unas altas tasas de respuesta. De esta forma controlaríamos posibles efectos dependientes del patrón de respuesta generados por la droga en la conducta operante (Sagvolden *et al*, 1988; Sanger and Blackman, 1976). Algunos clases de estimulantes psicomotores incrementan bajas tasas de respuesta, mientras que disminuyen las altas. Los animales fueron entrenados para responder por sacarosa hasta que alcanzaran una respuesta estable y consistente. Los tratamientos (10 mg/kg de AHN-1055 o salino) fueron introducidos de forma contrabalanceada en dos sesiones de test. El AHN-1055 incrementó el número de respuestas para la obtención de sacarosa un 23%. El

ANOVA mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,9} = 8.580$, $p < 0.017$) (Figura 13b).

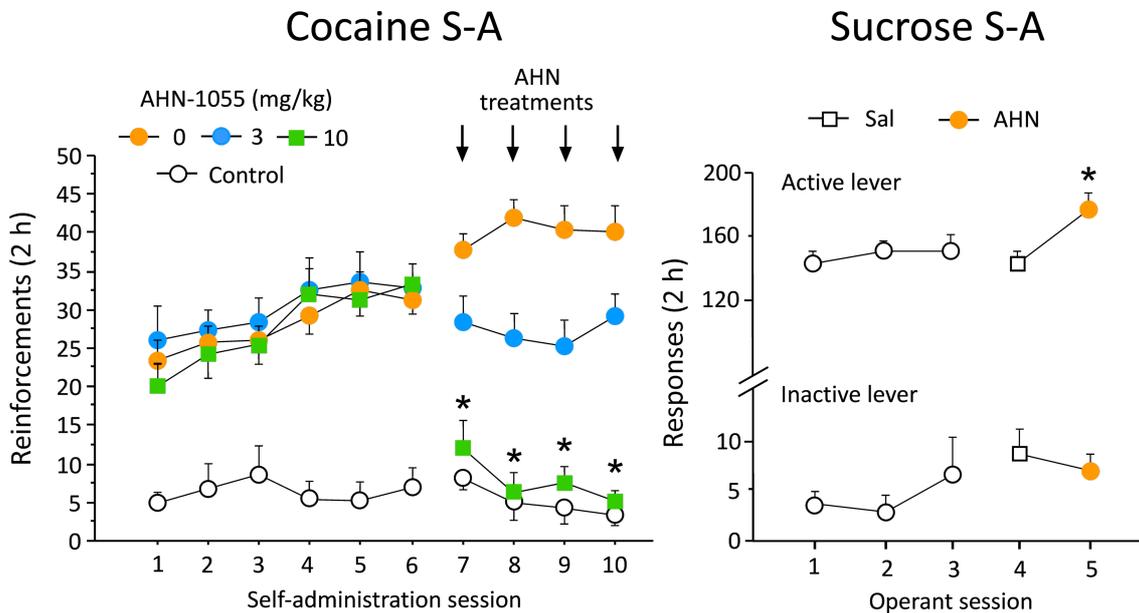


Figura 13. Efectos del AHN-1055 en la autoadministración de cocaína y en la respuesta operante mantenida por sacarosa. El tratamiento con AHN-1055 suprime de manera dependiente de la dosis la respuesta mantenida para la obtención de cocaína ($n = 6-7$ para los grupos experimentales; $n = 5$ para grupo control) (a). Por el contrario, el análogo incrementó el nivel de respuesta mantenida por sacarosa ($n = 10$) (b). * significativamente diferente de valores cocaína en (a) y de los valores salino en (b).

Estudio 4. El AHN-1055, al contrario que la cocaína, no produce una fuerte recaída en la búsqueda de droga tras dos semanas de abstinencia en animales con un historial de consumo estable.

Con el objetivo profundizar en el potencial adictivo del AHN-1055 en comparación con la cocaína, comparamos la intensidad de la “búsqueda de droga” en animales con un historial comparable de consumo de cocaína o del análogo tras un período de dos semanas de abstinencia. Para ello utilizamos a los cuatro grupos de ratas utilizados en el estudio anterior más otro grupo adicional entrenado en la autoadministración únicamente de AHN-1055. Tras el periodo de abstinencia

forzada los animales son devueltos al contexto en el que habían consumido activamente droga y se midió el número de respuestas en la palanca previamente asociada a la droga.

Los resultados mostraron que las ratas que habían tenido experiencia previa con cocaína mostraron altos niveles de respuesta en la palanca asociada a la droga tras un periodo de abstinencia y siendo reexpuestos al contexto donde consumieron. Este hecho se observó de forma similar en todos los grupos, incluso en aquellos que habían sido tratados con el análogo, y que habían reducido su consumo de cocaína durante las cuatro últimas sesiones de autoadministración antes de la abstinencia (tratados con 3 o 10 mg/kg de AHN-1055). Sorprendentemente, y al contrario que las ratas que se autoadministraron cocaína, las ratas que fueron entrenadas en la autoadministración del análogo no mostraron evidencias claras de recaída, siendo sus niveles de búsqueda de droga mucho menores. Se realizó un ANOVA factorial con una variable independiente "Tratamiento", con 5 niveles (tantos como los grupos que realizaron el test de recaída), mostrando un efecto significativo ($F_{4,25} = 11.577$, $p < 0.001$). Según las comparaciones *a posteriori* los tres grupos de ratas que habían sido expuestas a la cocaína durante el entrenamiento respondieron de forma diferente al grupo control y del grupo que administró AHN-1055 (Figura 14) ($p < 0.01$ mediante tests N-K). Es importante señalar que el historial de respuestas (infusiones) de los tres grupos cocaína y del grupo AHN-1055 previo al periodo de abstinencia forzada era equivalente (gráfica intertada en la Figura 14), excluyendo, de esta forma, la posibilidad de que la tasa de respuesta durante el entrenamiento pudiera haber condicionado el nivel de respuesta en el Test de Recaída.

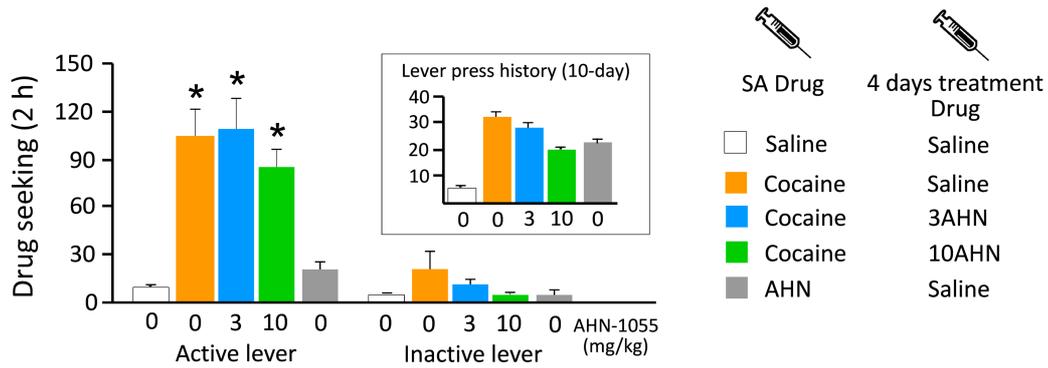


Figura 14. Efectos diferenciales de la autoadministración de AHN-1055 y de la autoadministración de cocaína en un test de recaída inducido por contexto. Todos los grupos entrenados en la autoadministración de cocaína, incluyendo aquellos que fueron tratados con el análogo durante 4 días para testar su influencia en el consumo, mostraron un elevado nivel de recaída tras un período de abstinencia. Al contrario, las ratas que se autoadministraron AHN-1055 obtuvieron niveles cercanos a los niveles del grupo control. Como se muestra en gráfica insertada, los niveles de respuesta para la obtención de droga fue comparable en todos los grupos experimentales (*) significativamente diferente de valores control.

Capítulo 2: Prevención de la recaída en el consumo de cocaína mediante un tratamiento sustitutivo con el AHN-1055

Este estudio ha sido publicado en *Addiction Biology*. 2012 28 Jun. Ver Anexo II.

INTRODUCCIÓN.

La recaída en el consumo de drogas es el problema clínico más significativo en el tratamiento de la adicción a las drogas. Además de los estímulos condicionados con la droga y de factores estresantes, una de las mayores causas desencadenantes de la recaída es la propia exposición a la droga (Kalivas *et al*, 2003a; Shaham *et al*, 2003). En adictos detoxificados, la reexperimentación de los efectos de la droga de la que se abusó tiempo atrás a menudo evoca o intensifica el “*craving*” o ansia por la droga y precipita la recaída en el consumo incluso después de largos períodos de abstinencia (Mahoney *et al*, 2007). En animales de laboratorio la reexposición a la droga (*priming*) produce que el animal reinstaure la conducta previamente extinguida de búsqueda de droga. Este fenómeno es puede ser elicitado incluso tras períodos extensos de abstinencia (desde varias semanas a meses) (Bossert *et al*, 2005). El modelo de *reinstatement* o reinstauración de la conducta se ha utilizado ampliamente para evaluar las intervenciones conductuales y farmacológicas para prevenir la recaída (Epstein *et al*, 2006).

El tratamiento y la prevención de la adicción a la cocaína constituye un difícil desafío. Abundante evidencia experimental ha mostrado que la abstinencia de varias drogas de abuso, entre ellas la cocaína, disminuye la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico (Rossetti *et al*, 1992; Weiss *et al*, 1992). La función dopaminérgica se encuentra comprometida durante fases críticas del proceso adictivo, como en la abstinencia. Esta hipodopaminergia podría intensificar la anhedonia, la disforia y el déficit motivacional para los estímulos no relacionados con la droga, además de ser una importante “fuerza” que puede predisponer a la recaída (Koob *et al*, 1997; Melis *et al*, 2005). En la adicción a la cocaína, esta hipótesis ha inspirado grandes esfuerzos para el desarrollo de fármacos de acción

prolongada que podrían actuar como medicaciones sustitutivas, reequilibrando la neurotransmisión dopaminérgica (Rothman *et al*, 2008a; Tanda *et al*, 2009b). A pesar de que este acercamiento ha sido utilizado para el tratamiento de adictos a opiáceos (Bickel *et al*, 1987) y para el tratamiento de la adicción a la nicotina (Cornuz, 2006), la evidencia existente, tanto clínica como preclínica, de que un fármaco sustitutivo prodopaminérgico con bajo potencial adictivo podría prevenir la recaída tras un período de abstinencia es prácticamente inexistente. Estudios previos sugieren que un tratamiento crónico de mantenimiento podría ser una estrategia efectiva en la adicción a la cocaína. Un tratamiento de mantenimiento con el opioide sintético buprenorfina, facilitó la extinción de la autoadministración de cocaína y atenuó el “reinstatement” inducido por esta droga en ratas (Sorge *et al*, 2005). Además, ensayos clínicos usando una administración oral de dexanfetamina y metanfetamina (Grabowski *et al*, 2001; Mooney *et al*, 2009; Shearer *et al*, 2003) han mostrado resultados positivos con adictos a la cocaína. Sin embargo, no se ha demostrado que un sustituto farmacológico con un perfil de bajo abuso proteja a largo plazo sobre la vulnerabilidad a la búsqueda de droga, como predice la teoría (Gorelick *et al*, 2004; Rothman *et al*, 2008a). Esta falta de evidencia subraya un vacío existente en nuestro conocimiento actual.

Para enfrentarnos a este desafío usamos un inhibidor de la recaptación de dopamina de duración prolongada, el 3 α -[bis(4'-fluorofenil)metoxi]-tropano, AHN-1055, cuyas características son consistentes con las de una medicación sustitutiva para la adicción a la cocaína (Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009), y testamos su habilidad para bloquear la recaída en la búsqueda de cocaína inducida por un *priming* de cocaína tras un procedimiento de autoadministración de esta droga. Para explorar los mecanismos neuronales a la base de los efectos observados nos centramos en el córtex prefrontal medial (mPFC), más concretamente en la corteza prelímbica y el córtex cingulado anterior (PrLC y Cg1) debido a que son regiones clave tanto en los fenómenos de recaída como en la aparición y control de la motivación de búsqueda de droga (Kalivas, 2008; Shaham *et al*, 2003). Llevamos a cabo análisis de proteínas involucradas en los efectos a largo plazo de la cocaína como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), c-Fos y FADD (García-Fuster *et al*. 2009; Ghitza *et al* 2010; Ciccocioppo *et al* 2001).

PLAN EXPERIMENTAL

Un esquema del plan experimental se detalla en la Tabla 2

Estudio 1. Entrenamiento en el consumo de cocaína y efectos de la sustitución de la droga por AHN-1055, anfetamina o salino.

(Descrito en la sección 5.3.1. del apartado de Material y Métodos)

Los animales fueron entrenados bajo un programa de refuerzo FR1 durante 1h durante un mínimo de 10 sesiones con una variabilidad menor del 20% en las tres últimas. Una vez alcanzado el criterio de estabilidad, la cocaína fue sustituida de manera aleatoria en cada uno de los grupos experimentales por salino (CO-SAL), anfetamina (0.1 mg/kg/infusión; CO-AMPH) y AHN-1055 (0.50 mg/kg/infusión; CO-AHN_0.5 o 0.17 mg/kg/infusión; CO-AHN_0.17). Los animales realizaron un total de 18 sesiones de sustitución antes de ser sometidas a los test de recaída.

Estudio 2. Test de recaída inducido por reexposición a la cocaína.

(Descrito en la sección 5.3.2. del apartado de Material y Métodos)

Tras las sesiones en las que los animales habían recibido la sustancia sustitutiva, todos los grupos excepto el que sustituyó por anfetamina fueron divididos en dos con el objetivo de poder realizar el test de recaída bajo el efecto de cocaína y solución salina.

Estudio 3. *Detección y cuantificación de proteínas mediante técnicas inmunológicas (Western Blotting).*

(Descrito en la sección 7 del apartado de Material y Métodos)

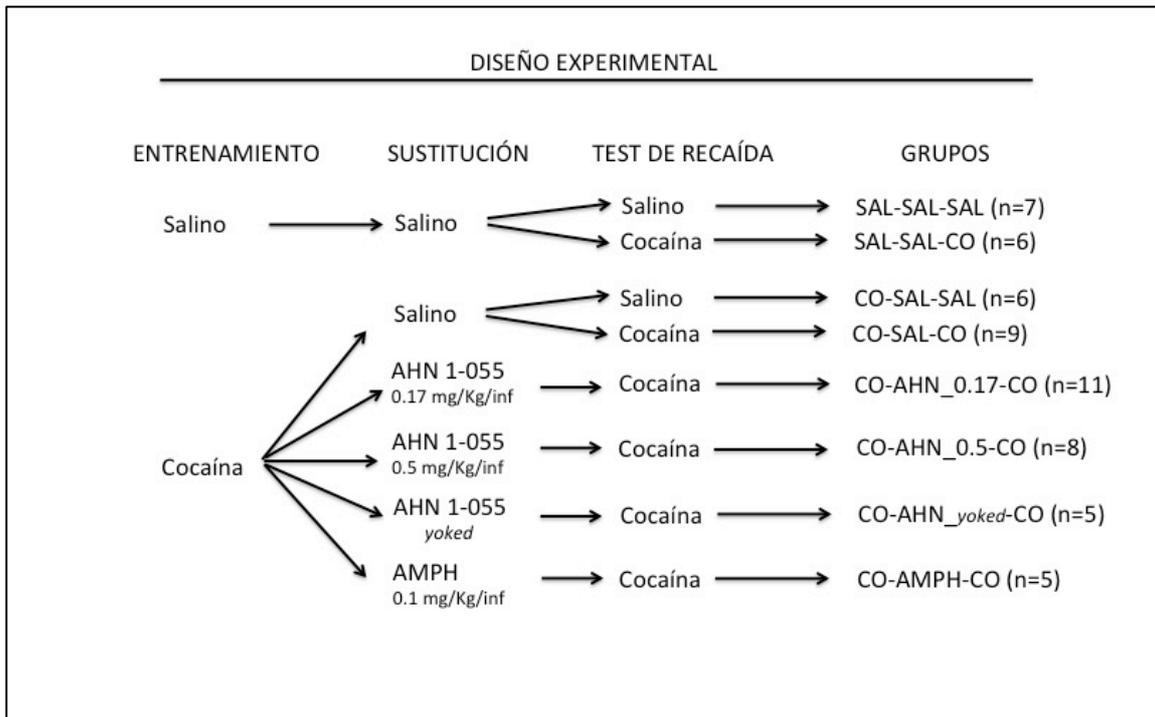


Tabla 2. Diseño experimental para el estudio de los efectos de la terapia sustitutiva. Las ratas fueron entrenadas a autoadministrarse solución salina o cocaína (0.5 mg/kg/infusión) que posteriormente fue sustituida por salino, AHN-1055 (dosis 0.17 o 0.50 mg/kg/infusión) o AMPH (0.1 mg/kg/infusión). Un grupo de ratas (grupo CO-AHNYoked-CO) fueron apareadas con el grupo que sustituyó con las dosis alta de AHN-1055, de manera que recibieron el tratamiento sustitutivo de forma pasiva cuando sus ratas asociadas de lo autoadministraban. En el test de recaída, las ratas recibieron una inyección de salino o cocaína (10 mg/kg i.p.).

RESULTADOS

Estudio 1. La sustitución con AHN-1055 produjo una extinción de las respuestas en la palanca activa en ratas con una historia estable de autoadministración de cocaína.

Los animales fueron entrenados en un programa de refuerzo FR1 hasta que alcanzaron respuestas consistentes. Cinco grupos de ratas fueron equivalentes en su consumo de cocaína antes de la introducción de la droga sustitutiva. El análisis

de varianza se realizó con un factor entresujetos, Tratamiento, con 5 niveles (cuatro grupos experimentales y un grupo control) y una variable intrasujetos, Sesión, con 10 niveles (uno por cada sesión de autoadministración realizada durante la fase de entrenamiento). El análisis mostró un efecto principal del factor Tratamiento ($F_{4,432} = 60.764, P < 0.0001$). Durante la fase de entrenamiento, el número medio de respuestas por sesión sobre la palanca activa fue muy similar en todos los grupos que se autoadministraban cocaína (Figura 15). Después de introducir el tratamiento sustitutivo la conducta de las ratas varió en función de la sustancia sustitutiva recibida. El ANOVA alcanzó efectos significativos en la variable Tratamiento ($F_{4,47} = 25.699, P = 0.0001$), y en la interacción Tratamiento x Sesión ($F_{68,799} = 3.325, P = 0.0001$). El análisis comparando los datos de autoadministración de cocaína de los tres últimos días de entrenamiento con los tres últimos días de sustitución mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{4,47} = 11.596, P < 0.0001$) (figura 15 insertada). Según lo esperado, cuando se sustituyó la cocaína por la anfetamina los animales rápidamente cambiaron de un compuesto al otro mostrando una respuesta consistente a lo largo de las 18 sesiones de sustitución (Figura 15). El AHN-1055, por otra parte, no se comportó como un estimulante clásico durante este periodo. En las primeras sesiones, las respuestas por la dosis baja de AHN-1055 fueron las más altas. Comparado con las tasas de respuestas producidas por la sustitución con salino o con la dosis alta de AHN-1055, responder por la dosis baja del análogo fue significativamente incrementada en la segunda sesión de sustitución (Figura 15).

Tras varias sesiones en las que la búsqueda de droga (y de consumo en el caso de los grupos que sustituían por AHN-1055) se mantuvo fuerte, la respuesta de los animales comenzó progresivamente a disminuir hasta alcanzar el criterio de extinción, que fue establecido en un número de infusiones por sesión menor de 10 durante tres días consecutivos. Todos los grupos alcanzaron el criterio excepto los animales del grupo CO-AMPH, que no extinguieron. Incluso tras 18 sesiones de sustitución, los animales que sustituyeron la cocaína por salino (grupo CO-SAL) todavía mantenían un cierto nivel de respuestas sobre la palanca activa. La media de respuestas de este grupo en la palanca activa durante las tres últimas sesiones fue 7.76 ± 1.06 , alcanzando el grupo SAL-SAL una media de 1.05 ± 0.31 respuestas (Figura 15). Los grupos que sustituyeron por AHN-1055 respondieron de manera

similar al grupo CO-SAL, siendo la media de respuestas 3.91 ± 0.75 para el grupo CO-AHN-1055 (0.17 mg/kg/infusión), y 7.48 ± 1.79 para el CO-AHN-1055 (0.5 mg/kg/infusión). Para los grupos CO-SAL, CO-AHN-1055 (0.17 mg/kg/infusión) y CO-AHN-1055 (0.5 mg/kg/infusión), pero no para el grupo CO-AMPH, los niveles de respuesta en las sesiones 16-17-18 se redujeron significativamente respecto a las sesiones de estabilidad 8-9-10 de la fase de entrenamiento con cocaína (Figura 15, insertada).

Estudio 2. La sustitución con AHN-1055 bloquea el reestablecimiento de la búsqueda de droga inducido por cocaína.

Con el objetivo de testar la eficacia de la terapia sustitutiva se realizó un test de *reinstatement* (reestablecimiento de la conducta) el día siguiente a la última sesión con el tratamiento sustitutivo. Los sujetos del grupo CO-AMPH fueron excluidos debido a que no extinguieron la conducta de palanqueo. El ANOVA fue realizado con un factor entre sujetos, Tratamiento, con 7 niveles (6 grupos experimentales y el grupo control). Los resultados mostraron un efecto significativo de esta variable ($F_{6,45} = 9.668$, $P < 0.0001$). Como esperábamos el *priming* de cocaína (10 mg/kg) produjeron un fuerte *reinstatement* de la conducta de búsqueda de droga en el grupo que recibió sustitución con salino (CO-SAL-CO), mientras que la administración de salino (grupo CO-SAL-SAL), y presumiblemente el estrés asociado con la manipulación, indujo solamente un ligero incremento en la respuesta (Figura 16).

Es importante señalar que los dos grupos que realizaron la sustitución con AHN-1055, grupos CO-AHN-1055 (0.17 mg/kg/infusión) y CO-AHN-1055 (0.5 mg/kg/infusión), así como el grupo yoked, exhibieron una conducta de búsqueda de droga significativamente atenuada, comparada con la condición experimental CO-SAL-CO. Los niveles de búsqueda de droga en los tres grupos que sustituyeron por el análogo, no mostraron diferencias significativas respecto al grupo que había recibido entrenamiento en consumo de cocaína y no recibió inyección de cocaína en el test (CO-SAL-SAL) (Figura 16).

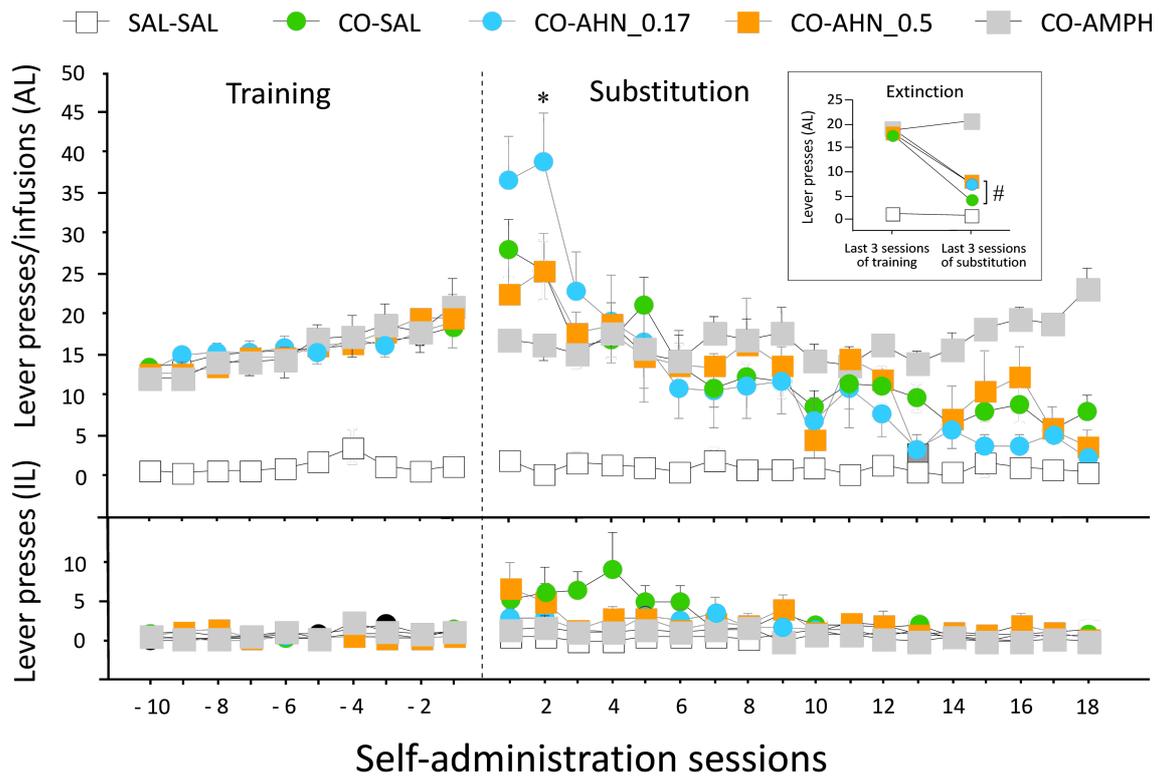


Figura 15. El tratamiento de sustitución con AHN-1055 conduce a la extinción de las respuestas sobre la palanca activa.

Tras un periodo de entrenamiento en la tarea de autoadministración para obtener cocaína en el que todos los grupos, a excepción del grupo control, mantenían tasas de respuestas similares, la droga fue sustituida por diferentes sustancias. Aquellos animales en los que la cocaína fue sustituida por anfetamina no modificaron su tasa de respuesta, mientras que aquellos que sustituyeron por el análogo AHN-1055 fueron disminuyéndola de manera progresiva hasta alcanzar el criterio de extinción alcanzando valores similares a los del grupo control. Aquel grupo de animales que sustituyó por la dosis baja del análogo CO-AHN-1055 (0.17 mg/kg/infusión) mostró durante las dos primeras sesiones de sustitución un incremento en las respuestas, estadísticamente significativo en la segunda sesión, pero que disminuyó considerablemente en la sesión posterior llegando también a la extinción.

El número de sujetos por grupo fue el siguiente: SAL-SAL (n = 13), CO-SAL (n = 15), CO-AHN-1055 (0.17 mg/kg/infusión) (n = 11), CO-AHN-1055 (0.5 mg/kg/infusión) (n=8) y CO-AMPH (n=5). (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo CO-SAL; (#) $P < 0.01$ comparado con el grupo CO-AMPH; (AL) palanca activa; (IL) palanca inactiva.

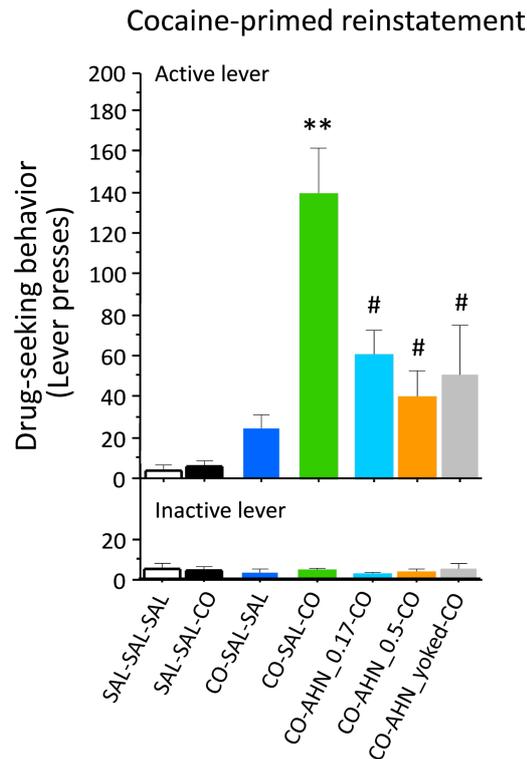


Figura 16. La terapia sustitutiva con el análogo AHN-1055 previene el *reinstatement* de la búsqueda de cocaína inducido por un *priming*. El *priming* con cocaína produjo un fuerte *reinstatement* de la conducta de búsqueda en el grupo entrenado con cocaína y sustituido con salino CO-SAL-CO. Comparaciones *post-hoc* del efecto Tratamiento mostraron que los animales del grupo CO-SAL-CO difirieron significativamente de los animales del grupo CO-SAL-SAL los cuales no recibieron el *priming* de cocaína. Ninguno de los tres grupos expuestos al AHN-1055 durante la sustitución, difirió estadísticamente del grupo CO-SAL-SAL. Además, la conducta de búsqueda de droga fue mucho más reducida en estos tres grupos que en el grupo CO-SAL-CO. El número de sujetos por grupo fue SAL-SAL-SAL (n = 7), SAL-SAL-CO (n = 6), CO-SAL-SAL (n = 6), CO-SAL-CO (n = 9), CO-AHN-1055 (0.17 mg/kg/infusión) (n = 11), CO-AHN-1055 (0.5 mg/kg/infusión) (n = 8) y CO-AHN-1055 yoked (n = 5). (*)P<0.05 comparado con el grupo CO-SAL-SAL; (#)P<0.01 comparado con el grupo CO-SAL-CO; (AL) palanca activa; (IL) palanca inactiva.

Estudio 3. El patrón de expresión de proteínas en el mPFC es análogo a los efectos conductuales de búsqueda de droga en el test.

El ANOVA de dos vías mostró diferencias entre los distintos grupos de tratamientos en todas las proteínas cuantificadas; c-Fos ($F_{6,24}=19.1$, $P<0.0001$), precursor BDNF ($F_{6,12}=19.5$, $P<0.0001$), BDNF maduro ($F_{6,12}=13.8$, $P<0.0001$) y FADD ($F_{6,24}=31.9$, $P<0.0001$). En ratas sin experiencia previa con la droga, la administración aguda de cocaína (grupo SAL-SAL-CO) aumentó significativamente la inmunoreactividad de la proteína c-Fos (+96%), del precursor del BDNF (+58%) y BDNF maduro (+115%) y de la cantidad total de proteína FADD (+96%) en el mPFC, comparado con los niveles observados en los animales control (grupo SAL-SAL-SAL). En las ratas que fueron expuestas previamente a la cocaína, la cantidad de estas proteínas no difirió de la de aquellos animales que no volvieron a tener experiencia con la droga después de las sesiones de entrenamiento (grupo CO-SAL-SAL) (Figura 17).

Usamos la expresión de c-Fos como marcador de activación neuronal en el mPFC. Tras la autoadministración de cocaína, el tratamiento sustitutivo y la extinción, el *priming* de cocaína produjo una marcada elevación de la expresión de c-Fos en el grupo CO-SAL-CO. Comparaciones *post-hoc* mostraron que la sustitución con AHN-1055 previno los efectos estimulantes de la cocaína en la expresión de c-Fos. Sin embargo, sólo la dosis alta del tratamiento sustitutivo con AHN-1055 (0.5 mg/kg/infusión) y el grupo *yoked*, bloquearon los efectos inducidos por la cocaína en los contenidos de c-Fos (Figura 17A).

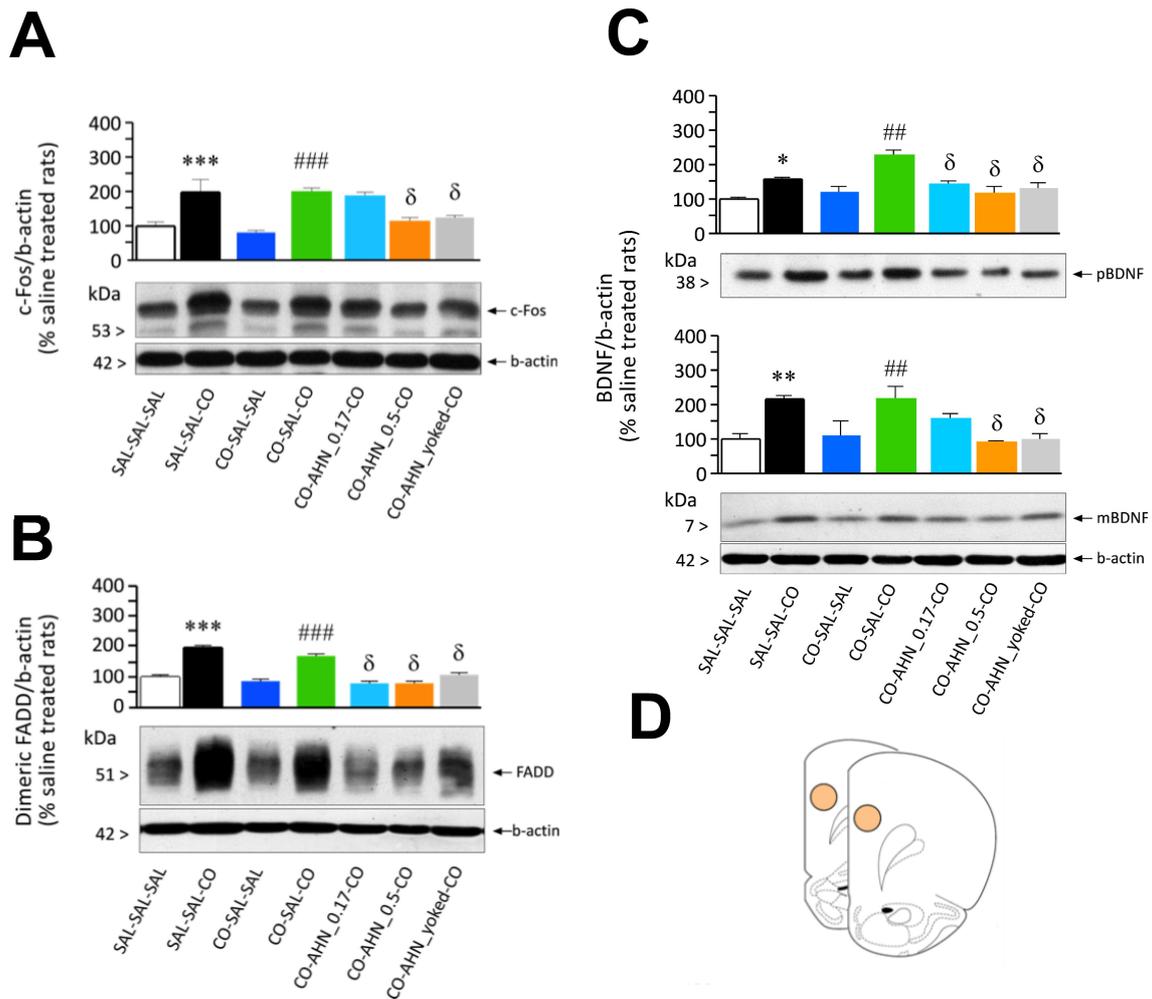


Figura 17. La sustitución con el análogo AHN-1055 produce en ratas la supresión de la expresión de las proteínas c-Fos, BDNF y FADD en el mPrC. (A-C) Efectos de los *primings* con salino o cocaína tras realizar las sesiones de sustitución sobre la expresión de c-Fos, precursor de BDNF y BDNF maduro y FADD. (D) Diagrama que representa las regiones prelímbica y anterior del cortex cingulado (PrLC y Cg1) de las que fueron recogidas las muestras de tejido para realizar el análisis de proteínas. Secciones corticales correspondientes a diagramas localizados 3.2 y 3.7 mm de bregma (Paxinos & Watson 2007) (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ comparado con el grupo SAL-SAL-SAL; (##) $P < 0.01$, (###) $P < 0.001$ comparado con el grupo CO-SAL-SAL; (AL) palanca activa; (IL) palanca inactiva. Las masas moleculares de las proteínas fueron estimadas en base a referencias estándar.

En los animales con experiencia en la autoadministración de cocaína, la inyección de droga antes del test de *reinstatement* indujo un aumento significativo en los niveles tanto del precursor de BDNF como del BDNF maduro, por encima de los niveles inducidos por la cocaína en ratas sin experiencia previa de droga. El tratamiento sustitutivo disminuyó significativamente y de forma dependiente de la dosis la sobreexpresión de BDNF maduro e inmaduro y producida por la inyección de cocaína (Figura 17B).

Los niveles de proteína FADD se mostraron elevados tras la inyección de cocaína, independientemente de si los animales habían tenido o no experiencia previa con la droga. Sin embargo, el *priming* de cocaína no produjo incremento en los niveles de FADD en el mPFC de las ratas que voluntariamente se autoadministraron AHN-1055 o que lo recibieron pasivamente durante el procedimiento yoked, como mostraron los test *post-hoc* (Figura 17C). Estos tratamientos no alteraron significativamente los contenidos de p-Ser191 FADD en el mPFC (datos no mostrados).

Capítulo 3. Estudio sobre el potencial de abuso del inhibidor del transportador de dopamina JHW-007 y de su influencia en el consumo de metanfetamina.

Los resultados de este estudio han sido publicado en *Eur J Pharmacol* May 15;731:73-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.03.015. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24675149. Ver Anexo III.

INTRODUCCIÓN

La metanfetamina (METH) es una droga simpatomimética altamente adictiva que produce euforia e incrementa el estado de alerta y motivación. El abuso de esta sustancia se ha convertido en un grave problema sanitario y social en muchos países, especialmente en Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y el Sureste de Asia, en los que su uso se ha relacionado con la aparición de psicosis, violencia y crímenes (Chen *et al*, 2010; Cottencin *et al*, 2012; Maxwell and Rutkowski, 2008). A pesar de sus devastadores efectos en adictos, no existen medicaciones disponibles que hayan sido aprobadas por la *US Food and Drug Administration* ni por Agencias Europeas de Medicamentos. La METH y otros psicoestimulantes, como la anfetamina y cocaína, ejercen sus acciones estimulantes y euforizantes principalmente a través de su interacción con el DAT. La METH, como otros derivados de la anfetamina, penetra en el citosol de las neuronas dopaminérgicas a través del DAT o por difusión a través de la membrana plasmática e interactúa con transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT2) produciendo la liberación de la DA de los almacenes vesiculares al citosol (Sulzer *et al*, 2005). El fuerte incremento en los niveles de DA intracelular provoca la reversión masiva del flujo de transporte a través del DAT provocando la salida de DA de la neurona presináptica a la hendidura sináptica (Fleckenstein *et al*, 2007; Goodwin *et al*, 2009). El uso prolongado de METH produce neuroadaptaciones en las neuronas dopaminérgicas presinápticas, que incluyen cambios en la función del DAT y en los transportadores VMAT2 localizados en la membranas de las vesículas

en las que se almacena el neurotransmisor (Chu *et al*, 2008; Fleckenstein *et al*, 2009; Volz *et al*, 2007). En humanos, el consumo de METH se ha asociado a un nivel dopaminérgico basal reducido (Volkow *et al*, 2001), hecho que podría contribuir a los síntomas característicos asociados con el periodo de abstinencia como son el *craving* y la falta de energía o anhedonia (McGregor *et al*, 2005). El DAT continúa siendo una de las principales dianas farmacológicas para el desarrollo de medicaciones que puedan ser útiles para el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes. En este sentido, se ha propuesto que compuestos con bajo potencial de abuso que pudieran normalizar el disminuido tono dopaminérgico, reduciendo así los efectos negativos provocados por el cese en el consumo de la droga, podrían constituir una herramienta terapéutica efectiva para el tratamiento de la adicción a estas sustancias (Anderson *et al*, 2009; Rothman *et al*, 2008b).

Por su alta afinidad por el DAT y por sus diferentes características farmacológicas y farmacodinámicas, algunos análogos derivados de la sustitución del grupo N de la BZT como el AHN-1055 o el JHW-007, se han postulado como candidatos para el desarrollo de tratamientos farmacológicos para la adicción a psicoestimulantes. Estos inhibidores atípicos de la recaptura de DA parecen mostrar un perfil marcadamente diferente al mostrado por los psicoestimulantes clásicos. Distintos estudios moleculares han sugerido que estos análogos podrían interaccionar con el DAT de forma diferente a como lo hace la cocaína. Estas diferencias en el modo de acción con el DAT producirían diferentes cambios conformacionales en el transportador, que podrían estar relacionados con sus diferentes efectos funcionales (Chen *et al*, 2004b; Loland *et al*, 2008). Por otra parte, la reconstrucción tridimensional del DAT, utilizando un modelo basado en la estructura homóloga del transportador bacteriano LeuT, ha permitido demostrar que se produce un solapamiento en el lugar de unión de la DA, anfetamina y los análogos de la BZT (Beuming *et al*, 2008; Bisgaard *et al*, 2011; Indarte *et al*, 2008). De este modo, la interacción de estos análogos de la BZT con el DAT podría estar impidiendo la unión con el transportador y, por tanto, reduciendo las acciones de los psicoestimulantes sin producir efectos indeseables por sí mismos.

Estudios *in vivo* han mostrado que el JHW-007 se une al transportador de DA con un ratio más lento que la cocaína (Desai *et al*, 2005a) produciendo un lento y

gradual incremento en la concentración de DA extracelular que se mantiene de forma prolongada. Este efecto contrasta con los incrementos agudos y de corta duración que induce la cocaína (Raje *et al*, 2005; Raje *et al*, 2002; Tanda *et al*, 2009a). Diferentes estudios comportamentales han demostrado, además, que este compuesto no exhibe las características propias de los psicoestimulantes, como capacidad de inducir fuerte estimulación locomotora, efectos recompensantes y alta eficacia reforzante (Hiranita *et al*, 2009; Katz *et al*, 2001). Asimismo, otros trabajos han mostrado que el JHW-007 y otros análogos de la BZT son capaces de antagonizar algunos de los efectos inducidos por los psicoestimulantes, como la preferencia de lugar condicionada inducida por la cocaína y la anfetamina (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2011) y la autoadministración (Ferragud *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2011), todo ello sin afectar significativamente la búsqueda y consumo de alimento y mostrando una menor capacidad para inducir la expresión de comportamientos estereotipados que otros psicoestimulantes (Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009; Li *et al*, 2013). En un estudio reciente se ha probado además, que el JHW-007 previene la sensibilización a largo plazo inducida por anfetamina así como los cambios estructurales producidos en las neuronas espinosas medianas del NAc tras una exposición crónica a la droga (Velazquez-Sanchez *et al*, 2013). En conjunto, estas evidencias sugieren que el JHW-007 podría mostrar eficacia terapéutica en modelos animales de adicción a la metanfetamina.

Los experimentos presentados en este capítulo tratan de caracterizar los efectos moduladores del JHW-007 tanto de los efectos estimulantes como las propiedades reforzantes inducidas por la metanfetamina mediante estudios de actividad locomotora y tests de consumo tanto con programas de refuerzo de razón fija como de razón progresiva.

PLAN EXPERIMENTAL

Estudio 1. Analisis de la estimulación locomotora inducida por el JHW-007 y de su interacción con la metanfetamina

(Descrito en la sección 3.2 del apartado de Material y Métodos)

Con el objetivo de estudiar las propiedades estimulantes del JHW-007 por sí mismo y de su interacción con la METH. Se administraron diferentes dosis de JHW-007 (0, 3, 10 mg/kg, i.p.) en combinación con METH (0.25, 0.75 mg/kg, i.p.) y se estudió los efectos de la actividad locomotora durante 7-8 días consecutivos. La METH se administró 1 hora después de la inyección del JHW-007, como en estudios previos (Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a; Velazquez-Sanchez *et al*, 2013). El registro de la actividad comenzó inmediatamente tras la administración del JHW-007. Una hora más tarde las ratas fueron inyectadas con METH o salino y el registro continuó durante otras 4 horas.

Estudio 2. Efectos del JHW-007 sobre el consumo de metanfetamina y sacarosa bajo programas de refuerzo de Razón Fija y Razón Progresiva

(Descrito en la sección 5.4 del apartado de Material y Métodos)

Varios grupos de ratas fueron entrenadas para recibir infusiones de metanfetamina: grupo METH 0.04 (0.04 mg/kg en 50 μ l/3 s; n= 7), grupo METH 0.12 (0.12 mg/kg en 150 μ l/9 s; n=7) y grupo 0 METH (salino en 50 μ l/3 s; n=5); o refuerzos de sacarosa: grupo SUCR (100 μ l sacarosa al 10% dispensada en 5 gotas; n=7). Los test de consumo consistieron en sesiones idénticas a las sesiones previas de entrenamiento, con la diferencia de que los animales fueron tratados con el análogo JHW-007 ((0, 3 y 10 mg/kg i.p.) una hora antes de comenzar la sesión de SA. Las ratas fueron testadas tanto bajo un programa de razón fija FR3 como bajo un programa de razón progresiva.

RESULTADOS.

Estudio 1. El JHW-007 no muestra efectos estimulantes por sí mismo y atenúa de manera dependiente de la dosis la estimulación locomotora inducida por la metanfetamina

Con el objetivo de caracterizar los efectos estimulantes inducidos por el JHW-007 tras su administración aguda y de su interacción con la METH, las ratas

recibieron diferentes del análogo como pretratamiento (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) y fueron colocadas en el campo abierto durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo los animales recibieron una inyección de METH (0, 0.25 y 0.75 mg/kg i.p.) y su actividad locomotora fue registrada durante un periodo adicional de 4 horas. Consideramos la distancia recorrida acumulada en intervalos de tiempo de 10 minutos como nuestra variable dependiente. El ANOVA se calculó con un factor entresujetos, Tratamiento, con 9 niveles (grupos experimentales que resultan de la combinación de 3 dosis de pretratamiento y 3 dosis de METH) y una variable intrasujetos, Tiempo, con 10 niveles (intervalos de tiempo de 10 minutos en un periodo total de 1 hora). El análisis no mostró efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{8,49} = 1.372$, $p = 0.2322$), pero sí lo hizo con el factor Tiempo ($F_{5,245} = 83.227$, $p < 0.001$) a causa del mayor comportamiento exploratorio de los animales al principio de la sesión (Figura 18). La interacción Tratamiento x Tiempo tampoco mostró resultados significativos ($F_{40,245} = 0.930$, $p = 0.5953$). Durante la primera hora los animales tratados con el análogo obtuvieron valores de locomoción similares a los del grupo tratado con salino. El JHW-007 no produjo, por lo tanto, ningún efecto sobre la locomoción a ninguna de las dosis testadas, ni indujo ningún comportamiento anómalo que pudiera estar interfiriendo con este resultado.

Inmediatamente después de la administración de METH emergieron notables diferencias en la actividad locomotora de los diferentes grupos experimentales. Los resultados obtenidos durante las 4 horas siguientes mostraron un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{8,49} = 20.464$, $p < 0.0001$), del factor Tiempo ($F_{23,1127} = 57.528$, $p < 0.0001$) y de la interacción entre ambos ($F_{184,1127} = 8.886$, $p < 0.0001$). Según lo esperado, la dosis más alta de METH (0.75 mg/kg i.p) produjo un fuerte incremento en la locomoción en comparación con el grupo que recibió salino, alcanzando la máxima actividad a los 20 minutos después de la administración de la droga. Este efecto fue disminuyendo progresivamente hasta alcanzar valores semejantes a los del grupo control 150 minutos de la inyección ($p < 0.05$, con tests N-K) (Figura 18A). La dosis baja de METH (0.25 mg/kg i.p), por su parte, produjo una suave elevación en la locomoción expresada únicamente durante la primera hora tras la administración de la droga ($F_{8,49} = 62.006$, $p < 0.0001$; $p < 0.05$, con tests N-K) (Figura 18B).

El JHW-007, que aparentemente no produjo efectos durante la primera hora tras su administración, bloqueó significativamente la locomoción inducida por la METH. Este efecto se manifestó de forma dosis dependiente. Así pues, la dosis de 10 mg/kg redujo de forma importante en la locomoción inducida por METH, efecto éste que se mantuvo durante al menos 2 horas (ANOVA 60-120 minutos: $F_{8,49} = 28.021$, $p < 0.0001$; $p < 0.05$, con tests N-K) (Figura 18B). El pretratamiento con la dosis de 3 mg/kg atenuó la rápida elevación inicial producida por la administración de la dosis alta de metanfetamina. Este bloqueo fue estadísticamente significativo durante los primeros 20 minutos después de la administración de la droga ($p < 0.05$, con tests N-K). Un efecto similar fue observado al analizar los resultados de los grupos que habían recibido como pretratamiento la dosis alta de JHW 007 y la dosis baja de METH, siendo en este caso, la reducción significativa durante los 30 minutos siguientes a la exposición a la droga ($p < 0.05$, con test N-K) (Figura 18A).

En conclusión, estos datos muestran que el pretratamiento con JHW-007 produce un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de la METH hacia abajo, y, en consecuencia, una atenuación de los efectos locomotores estimulantes inducidos por ésta.

Estudio. El JHW-007 reduce el consumo de metanfetamina sin afectar el consumo de sacarosa e incrementa la eficacia reforzante de ambas sustancias

Con el propósito de estudiar los efectos del JHW 007 sobre los efectos reforzantes de la METH así como la motivación por su consumo, dos grupos de ratas fueron entrenadas en la autoadministración de la droga a dosis de 0, 0.04 y 0.12 mg/kg/infusión. Para controlar la especificidad de los efectos, un grupo adicional de animales fue entrenado para obtener refuerzos de sacarosa y fue testado, asimismo, bajo la influencia del análogo.

El procedimiento y las condiciones experimentales tanto en el entrenamiento como en los tests fueron similares para ambos grupos. Los animales adquirieron la conducta operante para obtener el refuerzo, bien

metanfetamina o bien sacarosa, de una manera estable y consistente a lo largo de las sesiones (Figura 19A, 19B).

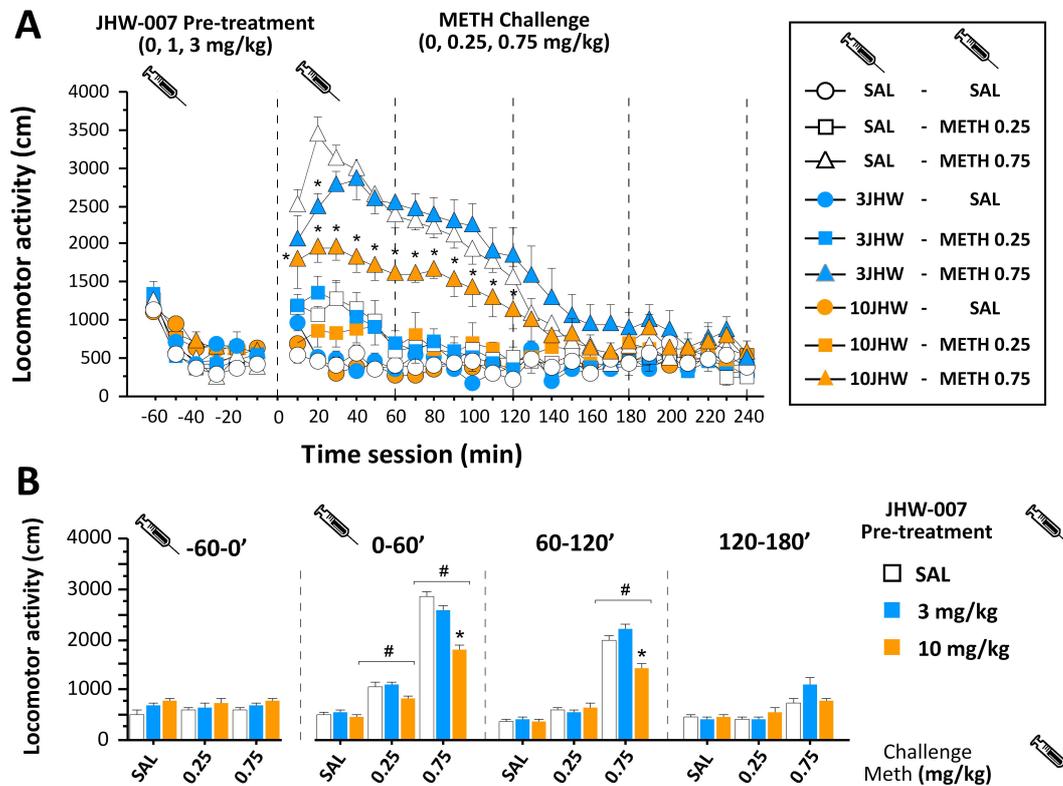


Figura 18. Efectos del JHW-007 y de su combinación con metanfetamina sobre la actividad locomotora. (A) Actividad locomotora representada en intervalos de 10 minutos y en (B) en intervalos de 1 hora. El pretratamiento con JHW-007 no produjo por sí mismo ningún efecto locomotor durante los 60 minutos siguientes a su administración. La administración de metanfetamina indujo un incremento de la actividad de manera dependiente de la dosis, que fue bloqueada, también, de forma dependiente de la dosis en los grupos pretratados con el análogo. El bloqueo producido por la dosis de 10 mg/kg de JHW 007 fue evidente durante todo el tiempo en el que la droga estaba ejerciendo su acción. Dos horas después de la administración de metanfetamina, las diferencias entre los grupos se desvanecieron, llegando a igualarse entre ellos y con el grupo control. Los valores representan la media \pm el error estándar. (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo SAL-METH (0.75 mg/kg); (#) indica diferencias significativas $P < 0.05$ comparado con los grupos que reciben salino como tratamiento.

Dos animales de cada grupo de METH fueron excluidos del experimento por no alcanzar los criterios de estabilidad y consistencia establecidos. Para analizar el consumo total de METH antes de comenzar los test de consumo, se realizó un análisis de varianza con una variable entresujetos, Dosis/Infusión, con 2 niveles (dosis de METH 0.04 y 0.12 mg/kg) y una variable intresujetos, Sesión, con 9 niveles (6 sesiones de autoadministración antes del primer test y las 3 últimas sesiones estables anteriores al segundo). El ANOVA no mostró ningún efecto significativo ni del factor Dosis/Infusión ($F_{1,8} = 0.346$, $p = 0.5725$), ni del factor Sesión ($F_{8,64} = 0.500$, $p = 0.8518$) ni de la interacción ($F_{1,8} = 8.886$, $p = 0.8329$) (Figura 19A derecha). Por lo tanto, independientemente de la dosis por infusión recibida, los animales ajustaron sus respuestas para la obtención de la misma dosis de METH por sesión (alrededor de 1.5 mg/kg), siendo el número de respuestas en los animales que recibieron la dosis de 0.04 mg/kg/infusión aproximadamente el triple que en el grupo de 0.12 mg/kg/infusión (Figura 19A izquierda).

Para testar los efectos del JHW-007 sobre las propiedades motivacionales de la METH, diferentes dosis del análogo (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) fueron administradas a los animales 1 hora antes de comenzar las sesiones de SA en un programa PR. El ANOVA del número de infusiones obtenido se llevó a cabo con una variable intresujetos, Tratamiento, con 4 niveles (grupos de tratamiento; salino, 0.04 y 0.12 mg/kg/infusión METH y grupo sacarosa) y una variable intresujetos, Pretratamiento, con 3 niveles (3 dosis de JHW 007 administradas; 0, 3 y 10 mg/kg i.p.). El ANOVA alcanzó un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{3,19} = 228.272$, $p < 0.0001$) y de la interacción Tratamiento x Pretratamiento ($F_{6,38} = 2.381$, $p = 0.0474$), pero no de la variable Pretratamiento por sí sola ($F_{2,38} = 2.085$, $p = 0.1383$). La administración de la dosis alta de JHW-007 redujo el número de infusiones obtenidas por el grupo que se autoadministró la dosis de 0.12 mg/kg/infusión de METH ($p < 0.05$, con tests N-K). Por otra parte, el análogo no produjo ningún efecto significativo en el consumo de sacarosa (Figura 19C).

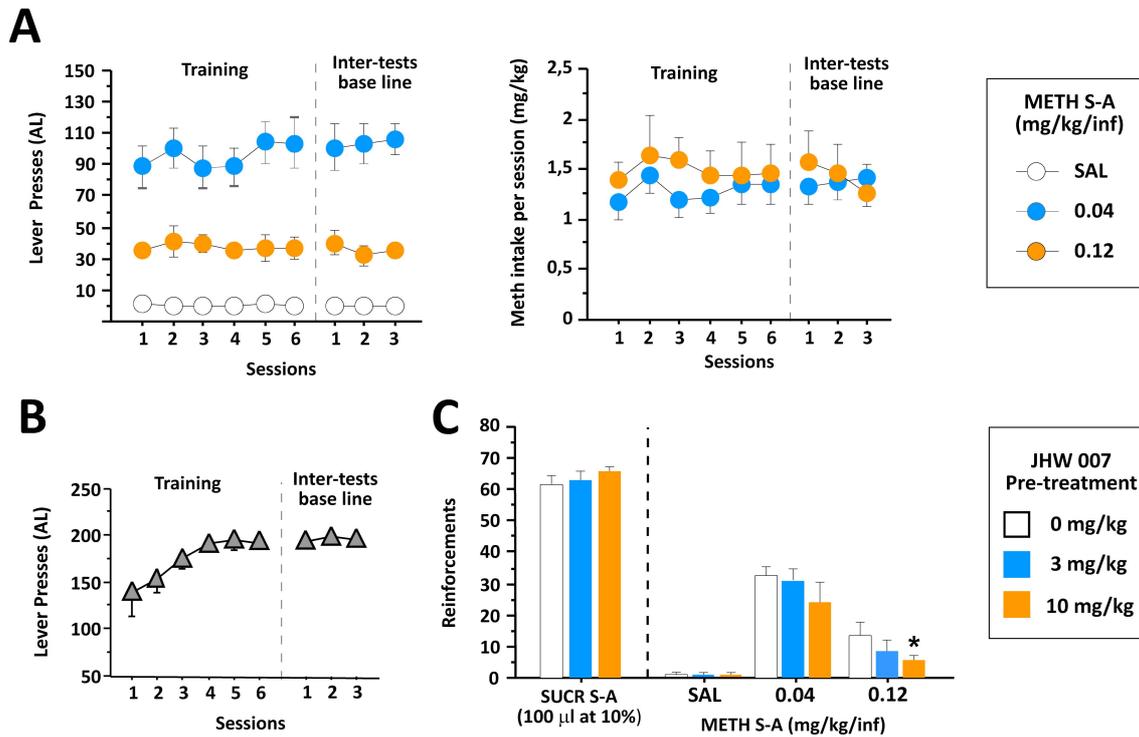


Figura 19. Resultados obtenidos de los ensayos de autoadministración. Los animales que se autoadministraron metanfetamina mostraron tasas de respuestas consistentes y estables durante las 6 sesiones previas a la realización de los tests, independientemente de la dosis infundida (A izquierda). Durante el entrenamiento, los animales de ambos grupos mostraron un consumo de metanfetamina similar por sesión (aproximadamente 1.5 mg/kg i.v.) (A derecha). De la misma manera, el grupo entrenado para recibir refuerzos de sacarosa alcanzó tasas de respuesta estables antes de ser testado (B). Durante el test de consumo, el tratamiento con la dosis alta de JHW-007 (10 mg/kg i.p.) produjo una reducción en el consumo de metanfetamina, resultando significativa en el grupo que recibió la dosis de 0.12 mg/kg/ infusión. Por el contrario, el análogo no afectó al consumo de sacarosa durante la realización de los tests (C). Los valores representan la media \pm el error estándar. (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo pretratado con salino.

Para estudiar los efectos del JHW 007 sobre la motivación por la búsqueda de METH, el análogo fue administrado a diferentes dosis (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) 1 hora antes de comenzar las sesiones de acceso prolongado a la droga (6 h), bajo un programa de refuerzo de PR. Cada sujeto fue testado bajo los efectos de cada una

de las dosis de JHW-007. El ANOVA del número de refuerzos obtenidos se analizó con una variable intrasujeto, Tratamiento, con 4 niveles (grupos de tratamiento; salino, 0.04 y 0.12 mg/kg/infusión METH y grupo sacarosa) y una variable intrasujeto, Pretratamiento, con 3 niveles (3 dosis de JHW 007 administradas; 0, 3 y 10 mg/kg i.p). El pretratamiento con el análogo produjo un efecto significativo en el número de refuerzos alcanzados por el grupo entrenado para la obtención de sacarosa ($F_{2,12} = 4.457$, $p = 0.0357$), siendo la dosis más alta de JHW-007 la que indujo un mayor incremento en la cantidad de refuerzos obtenidos ($p < 0.05$, con tests *post hoc* N-K). El ANOVA para los animales que respondieron por METH, mostró un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{2,12} = 12.351$, $p = 0.0012$) y del factor Pretratamiento ($F_{2,24} = 4.822$, $p = 0.0174$), aunque no de la interacción entre ambos ($F_{4,24} = 1.519$, $p = 0.2283$). Un análisis de la varianza adicional se realizó colapsando los dos grupos que se autoadministraron METH, mostrando un efecto significativo del pretratamiento con JHW 007 ($F_{2,18} = 5.688$, $p = 0.0122$). Por tanto, bajo los efectos de 10 mg/kg de JHW 007, la tasa de respuestas de los animales para obtener tanto METH como sacarosa se incrementa ($p < 0.05$, con tests N-K) (Figura 20C arriba).

Además, se observó que una tendencia inducida por el análogo incrementando la latencia en la que los animales obtuvieron el último refuerzo de sacarosa ($F_{2,12} = 3.030$, $p = 0.0860$).

El ANOVA para los grupos de METH mostró de nuevo un efecto del factor Tratamiento ($F_{2,12} = 31.650$, $p < 0.0001$) y Pretratamiento ($F_{2,24} = 7.079$, $p = 0.0038$), aunque nuevamente no de la interacción ($F_{4,24} = 1.925$, $p = 0.1388$). Un análisis adicional colapsando las dos dosis de METH indicó un efecto del JHW-007 en el tiempo en el que los animales habían recibido la última infusión de droga ($F_{2,18} = 8.237$, $p = 0.0029$), siendo bajo los efectos de 10 mg/kg de JHW-007 donde los animales prolongan más su tiempo de respuestas ($p < 0.05$, con tests N-K) (Figura 20C abajo).

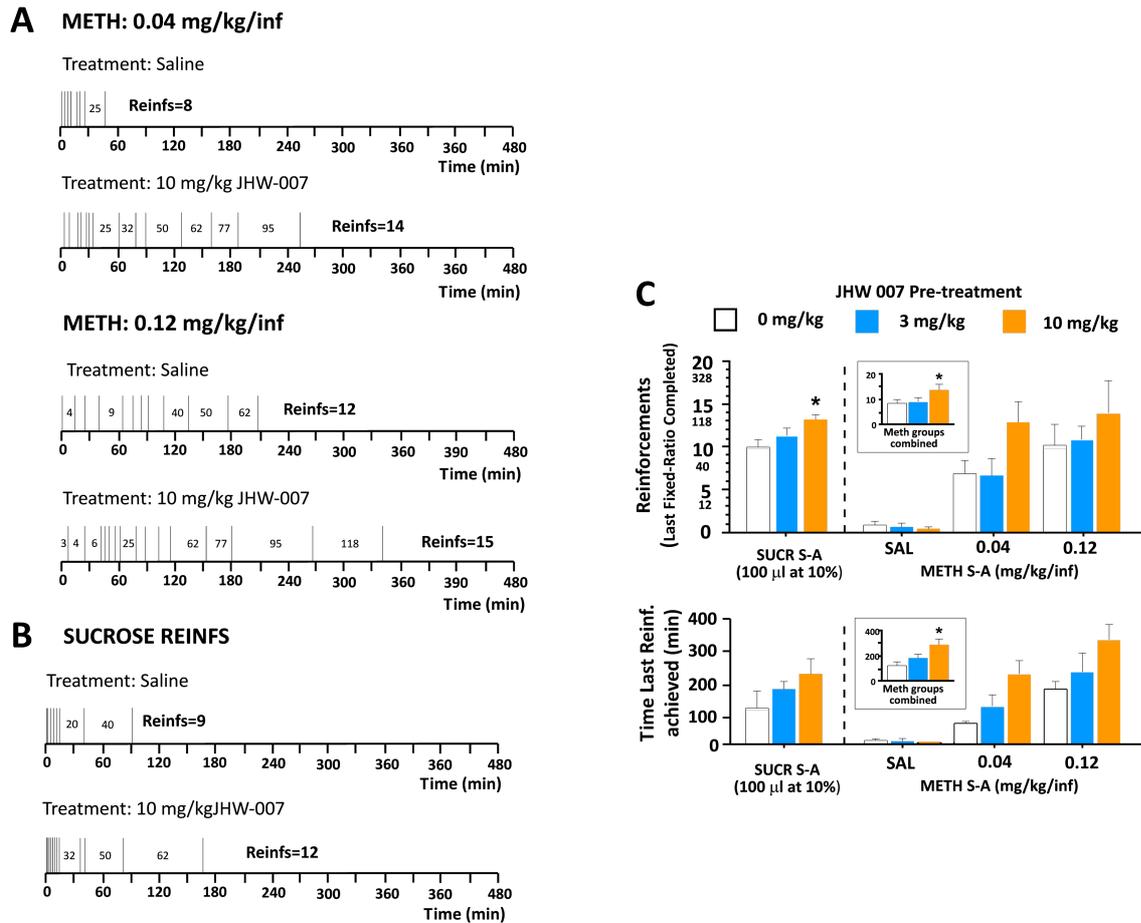


Figura 20. Resultados obtenidos de los test bajo un programa de refuerzo de razón progresiva. Ejemplos representativos de una sesión de autoadministración de metanfetamina a las dosis de 0.04 y 0.12 mg/kg/ infusión, bajo el pretratamiento con salino y 10 mg/kg de JHW-007 (A). Ejemplos representativos de una sesión de autoadministración de sacarosa bajo los efectos de salino y 10 mg/kg de JHW-007 (B). Efecto del pretratamiento de JHW-007 (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) en el número de refuerzos obtenidos para cada grupo en los tests de razón progresiva. La gráfica insertada representa el efecto del JHW 007 en el valor medio para ambos grupos de metanfetamina. Los animales, independientemente de si recibieron sacarosa o metanfetamina, alcanzaron el máximo número de respuestas bajo el efecto de la dosis alta del análogo (10 mg/kg) (C arriba). Efecto del pretratamiento de JHW-007 sobre el tiempo en el que el último refuerzo fue obtenido. La gráfica insertada representa el efecto del análogo en el valor medio para ambos grupos de metanfetamina. El JHW-007 incrementó la latencia en la consecución del último refuerzo de la sesión (C abajo). Los valores representan la media \pm el error estándar. (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo pretratado con salino.

En conclusión, el pretratamiento con JHW-007 produce un incremento en la eficacia reforzante tanto de drogas de abuso como de sustancias naturales, así como una tasa de respuestas más espaciada en el tiempo.

Capítulo 4: Agonistas TAAR y psicoestimulantes

Parte de este estudio se realizó en colaboración con Roche S.L. Parte de los resultados se publicaron en *Biological Psychiatry*. 2012 Dec 1;72(11):934-42.

INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado, el abuso de psicoestimulantes como la cocaína y la METH es, en muchos países un problema tanto clínico como social, problema que se agudiza debido a la ausencia de medicaciones específicas para tratarlo. A lo largo de los capítulos anteriores nos hemos centrado en la caracterización de los análogos de la BZT en diferentes modelos animales de adicción tanto a cocaína como METH, moléculas que podrían en un futuro ser consideradas como medicaciones para el tratamiento de la adicción a estos psicoestimulantes. En el capítulo en el que nos vamos a centrar ahora, vamos a estudiar moléculas con un enfoque diferente para tratar la adicción.

Las aminas de traza (TAs) como la feniletilamina (PEA) y la p-tiramina representan un grupo de aminas endógenas íntimamente relacionadas con las clásicas aminas biogénicas (Burchett and Hicks, 2006; Grandy, 2007). Durante décadas, se ha atribuido a estas TAs funciones fisiológicas en el cerebro a pesar de que se ha considerado que sus efectos son indirectos, motivo por el que se las ha denominado “falsos neurotransmisores” (Berry, 2007; Burchett *et al*, 2006) . Disregulaciones en el nivel de estas TAs han sido asociadas con varios trastornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, depresión, estados de ansiedad y Parkinson (Berry, 2007; Burchett *et al*, 2006).

La función concreta de estas TAs ha permanecido desconocida debido al desconocimiento de los receptores sobre los que pudieran actuar. Recientemente, estudios de clonación revelaron la existencia de una familia de receptores asociados a proteínas G, denominados receptores asociados a aminas de traza (TAARs), entre los cuales, los receptores TAAR1 y TAAR4 responden a TAs (4-8 paper). Dado que el receptor TAAR4 es un pseudogen presente tanto en humanos como en chimpancés (Lindemann *et al*, 2005a), el receptor TAAR1 es el que ha sido más investigado. La generación de ratones transgénicos que carecen de este

receptor TAAR1, ha revelado que actúa como un modulador negativo de la neurotransmisión monoaminérgica (Lindemann *et al*, 2008; Wolinsky *et al*, 2007). Estudios neuroanatómicos han mostrado que este receptor se encuentra en una subpoblación de neuronas dopaminérgicas coexpresado junto con el DAT (Xie and Miller, 2009; Xie *et al*, 2007b), sugiriendo que los TAAR1 se encuentran bien localizados para ejercer algún tipo de regulación en la transmisión dopaminérgica. La activación de estos TAAR1 se ha relacionado con una inhibición de la recaptura de DA y un incremento en la salida a través del DAT (Xie *et al*, 2007a; Xie *et al*, 2008). La posible implicación de estos receptores TAAR1 en los efectos inducidos por los psicoestimulantes parece convincente si se tiene en cuenta que varias de estas sustancias psicoactivas como la amfetamina o la metanfetamina, el MDMA y el LSD, son todos ellos agonistas de los TAAR1 (Bunzow *et al*, 2001; Grandy, 2007; Reese *et al*, 2007).

Los TAAR1 parecen ser proteínas diana altamente prometedoras para el desarrollo de medicaciones efectivas para el abuso de psicoestimulantes. A lo largo de este capítulo, estudiaremos los efectos de los agonistas parciales del receptor TAAR1, R05203648 y de los agonistas totales R05166017 y R05256390. El compuesto R05166017 ha mostrado especificidad en ratones mientras y siendo los otros dos compuestos específicos para el TAAR1 de ratas. A lo largo de los experimentos realizados, empleando diferentes modelos comportamentales como CPP, la autoadministración o estudios de actividad locomotora, se han generado datos preclínicos relevantes para predecir la efectividad de estos agentes agonistas del TAAR1 como posibles farmacoterapias para el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes en humanos.

PLAN EXPERIMENTAL

Estudio 1. Análisis de la actividad locomotora inducida por los compuestos R05203648 y R05256390, y de su interacción con la metanfetamina

(Descrito en la sección 3.4 del apartado de Material y Métodos)

Los animales recibieron diferentes dosis de uno de los dos agonistas TAAR1 (0, 3 o 10 mg/kg i.p para el R05256390 y 0, 1.67 o 5 mg/kg i.p para el R05203648)

y 10 minutos más tarde recibieron 0.75 mg/kg i.p de metanfetamina. Inmediatamente después de la administración de la metanfetamina las ratas fueron colocadas en los campos abiertos y la actividad locomotora fue registrada durante 4 horas

Estudio 2. Efectos del agonismo total del TAAR1, mediante el compuesto R05166017, sobre la preferencia de lugar condicionada y actividad locomotora inducida por cocaína

(Descrito en la sección 6 del apartado de Material y Métodos)

Los ratones recibieron diferentes dosis de R05166017 (0, 0.3, 1, 3, 10 y 20 mg/kg i.p) 30 minutos antes de recibir la cocaína (0 y 15 mg/kg i.p). Inmediatamente después de la administración de la droga los animales fueron colocados en el compartimentos correspondiente del CPP y se registró su actividad locomotora.

Estudio 3. Estudios sobre los efectos del agonismo parcial del TAAR1 sobre el consumo de cocaína mediante el compuesto R05203648.

(Descrito en la sección 5.5.1 del apartado de Material y Métodos)

Con el objetivo de estudiar la influencia de la activación parcial de los receptores TAAR1 en la autoadministración de cocaína, los animales (n=7-8 ratas/grupo) fueron entrenados para obtener infusiones de la droga (0.5 mg/kg por infusión en 100 µl/5 s). En el test, las ratas fueron tratadas de manera contrabalanceada con el agonista parcial R05203648 a diferentes dosis 0, 3 y 10 mg/kg i.p, 30 minutos antes de comenzar la sesión de autoadministración de cocaína.

Estudio 4. Efectos del agonismo TAAR1 sobre el consumo de sacarosa mediante los compuestos R05203648 y R05256390.

(Descrito en la sección 5.5.2 del apartado de Material y Métodos)

Los animales fueron entrenados para recibir refuerzos de sacarosa (100 µl

10% sacarosa administrado en 5 gotas). Una vez alcanzado el criterio de estabilidad, los animales recibieron diferentes dosis de cada uno de los dos compuestos (0, 3 y 10 mg/kg i.p para el R05203648 y 0, 1.67 o 5 mg/kg i.p para el R05256390).

RESULTADOS

Estudio 1. Efectos moduladores del agonismo TAAR1 mediante los compuestos R05203648 y R05256390 sobre la actividad locomotora inducida por metanfetamina.

Para testar la capacidad estimulantes de otros dos análogos TAAR1 y como modulaban el efecto estimulante inducido por otro psicoestimulante como es la metanfetamina, realizamos un estudio de la actividad locomotora de los animales en un campo abierto. El ANOVA se calculó con una variable entre sujetos "Tratamiento" con 3 niveles (3 dosis de cada uno de los análogos TAAR; 0, 1.67 y 5 mg/kg para el R05203648 y 0, 3 y 10 mg/kg para el R05256390) y una variable intra sujetos "Tiempo" (intervalos de 10 minutos en un periodo de 4 horas). Los resultados mostraron un efecto significativo del factor Tratamiento tanto para el R05203648 como el R05256390 ($F_{5,41} = 72.991$, $p < 0.0001$ y $F_{5,42} = 14.086$, $p < 0.0001$, respectivamente) y también un efecto de interacción de las variables Tratamiento x Tiempo para ambos compuestos ($F_{115,943} = 12.336$, $p < 0.0001$ para el R05203648 y $F_{115,966} = 8.195$, $p < 0.0001$ para el R05256390) (Figura 21A, 21B). El ANOVA de la primera hora de registro de actividad locomotora indicó también un efecto significativo del factor tratamiento para ambos compuestos ($F_{5,41} = 66.087$, $p < 0.0001$ para el R05203648 y $F_{5,42} = 27.439$, $p < 0.0001$ para el R05256390). Comparaciones *a posteriori* de este efecto revelaron que el pretratamiento con ambos agonistas TAAR1 bloqueó de manera dependiente de la dosis la hiperestimulación inducida por la metanfetamina, llegando la atenuación a ser significativa con la administración de la dosis alta de ambos compuestos (Figura 21C, 21D).

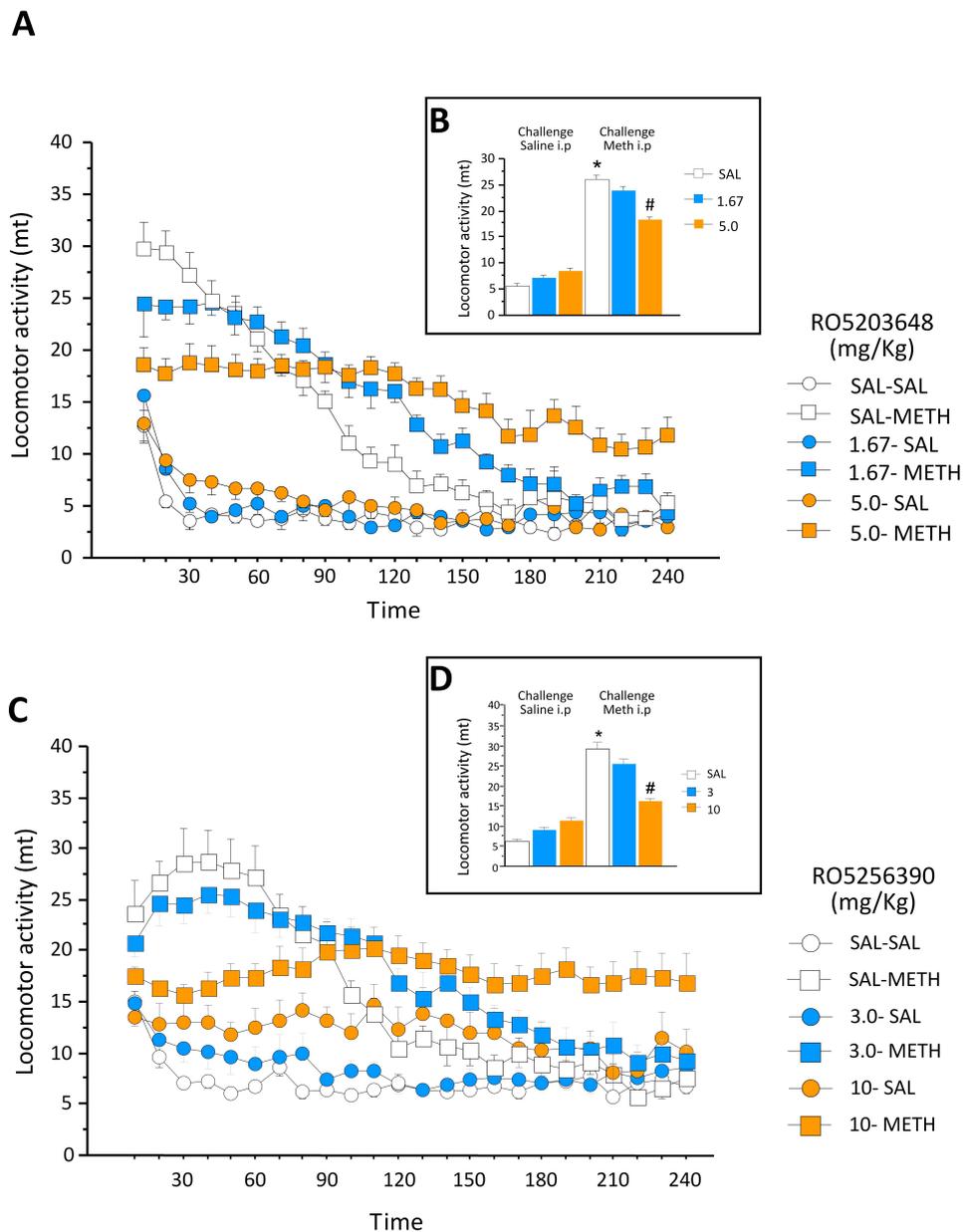


Figura 21: Patrón temporal de la actividad locomotora inducida por los compuestos administrados solos y su interacción con la metanfetamina. Las diferencias entre grupos son mucho más evidentes durante la primera hora de registro, mostrando un claro efecto estimulante en los animales que reciben metanfetamina, estimulación que aparece atenuada cuando se administran los compuestos como pretratamiento (A y C). El análisis de la primera hora de actividad indica que los compuestos por sí solos no producen ningún efecto locomotor en los animales, contrariamente a la metanfetamina que es significativamente estimulante. Este efecto hiperestimulante inducido por la droga es bloqueado de manera dependiente de la dosis en los animales que reciben los compuestos previamente a la droga (B y D). (*) indica diferente del valor del grupo salino, (#) indica diferente del valor del grupo cocaína.

Estudio 2. El agonismo parcial del TAAR1 mediante el compuesto R05166017 inhibe la estimulación locomotora inducida por cocaína, aunque no el CPP.

Para estudiar el posible efecto recompensante del agonismo total del TAAR, utilizamos el compuesto R05166017 y estudiamos sus efectos por si mismo como su los efectos de su interacción con la cocaína en un modelo de CPP en ratones. Los animales recibieron 0, 0.3, 1, 3, 10 o 20 mg/kg i.p del agonista TAAR1, 30 minutos antes de administrarles cocaína a la dosis de 0 o 15 mg/kg i.p. Se realizó un ANOVA con un factor entre sujetos, "Tratamiento" con 12 niveles (12 grupos experimentales resultantes de la administración combinada de las diferentes dosis de R05166017 con solución salina o cocaína) y un factor intra sujetos "Condicionamiento" con 2 niveles (Precondicionamiento y Test). Los resultados indicaron un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{11,116} = 2.378$, $p = 0.010$) y de la interacción Tratamiento x Condicionamiento ($F_{11,116} = 2.942$, $p = 0.001$) (Figura 22).

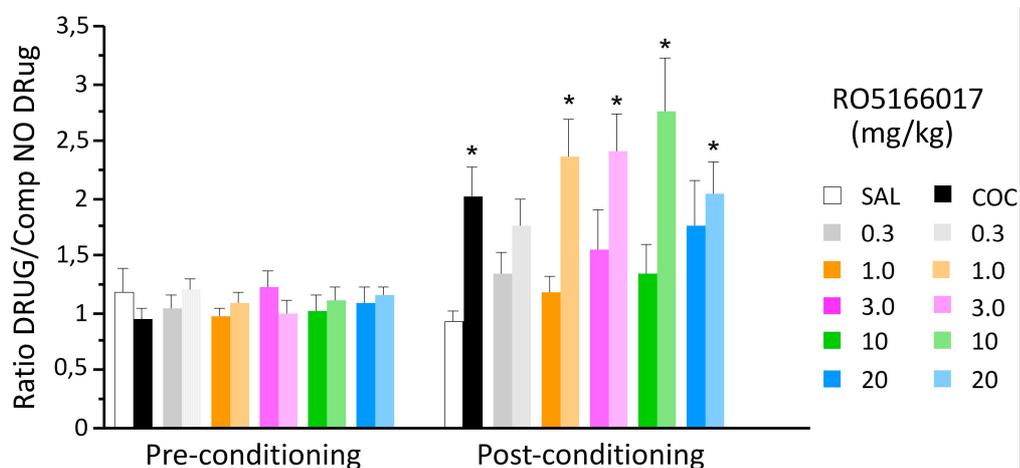


Figura 22: Efectos sobre la preferencia de lugar condicionada inducida por el agonista total R05166017 (0, 0.3, 1, 3, 10 y 20 mg/kg) y su interacción con cocaína. Contrariamente a lo observado con la cocaína, el R05166017 a ninguna dosis induce condicionamiento. Cuando es administrado como pretratamiento incrementa la preferencia inducida por la droga. (*) indica diferente del valor del grupo control.

A pesar de que no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos experimentales durante la sesión de preconditionamiento, análisis estadísticos *a posteriori* mostraron un incremento significativo de la preferencia en el grupo que había sido tratado con cocaína, mientras que el R05166017 por sí solo no produjo ningún tipo de preferencia o aversión por el compartimento asociado a sus efectos, a pesar de que parece haber un incremento dependiente de la dosis que no llega, en ninguno de los casos, a ser significativo. La administración combinada del R05166017 y cocaína incrementó la preferencia inducida por la droga, sugiriendo que el pretratamiento con el agonista TAAR1 puede aumentar el efecto recompensante (Fisher PLSD, $p < 0.05$).

Durante las sesiones de condicionamiento bajo los efectos de los tratamientos, se realizó un registro de la locomoción de los animales. El ANOVA se calculó con una variable entre sujetos "Tratamiento" con 12 niveles (12 grupos experimentales) y una variable intra sujetos "Sesión" (4 días de condicionamiento con los tratamientos). Los resultados indicaron un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{11,124} = 14.692$, $p < 0.0001$) y de la interacción Tratamiento x Sesión ($F_{3,33} = 1.997$, $p = 0.012$). El R05166017 bloquea de forma dependiente de la dosis la actividad locomotora inducida por cocaína (15 mg/kg), sin producir efectos estimulantes cuando se administró solo, utilizando un amplio rango de dosis (0.3-20 mg/kg) (Figura 23)

Estudio 3. El agonista parcial R05203648 bloquea el consumo de cocaína de manera dependiente de la dosis en ratas con un historial estable de consumo.

Debido a que los receptores TAAR1 interfieren con el sistema dopaminérgico y parecen influir en los procesos que subyacen al proceso adictivo, su acción fue investigada en el paradigma de autoadministración de cocaína. Se realizó un ANOVA utilizando una variable entre sujetos "Droga" con 2 niveles (salino o cocaína) y una variable intra sujetos "Tratamiento" con 3 niveles (3 dosis de R05203648). Los resultados mostraron un efecto significativo del factor Droga ($F_{1,13} = 86.271$, $p < 0.0001$) y una interacción significativa de los factores Droga x

Tratamiento ($F_{2,26} = 70.851$, $p < 0.0001$), indicando que el pretratamiento con el RO5166017 producía cambios en las curvas de autoadministración de cocaína.

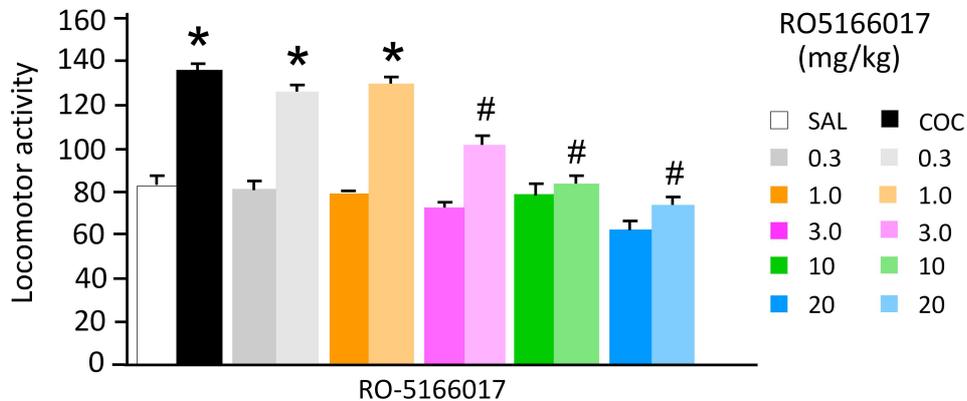


Figura 23: Efectos del agonista selectivo completo RO5166017 sobre la actividad locomotora inducida por cocaína. La administración de RO5166017 como pretratamiento disminuye de manera dependiente de la dosis la hiperestimulación inducida por la droga. (*) indica diferente del valor del grupo, (#) indica diferente del valor del grupo cocaína.

Análisis estadísticos *a posteriori* del efecto de interacción mostraron que el RO5203648 redujo de dependiente de la dosis y de forma significativa con la dosis alta de compuesto, el consumo de cocaína en ratas que previamente habían mostrado un historial estable de autoadministración intravenosa de droga (Newman Keuls, $p < 0.05$) (Figura 24). Estos resultados indican que la actividad TAAR1 impacta en los procesos que subyacen a los efectos reforzantes inducidos por la cocaína.

Estudio 4. Estudio de los efectos de los agonistas TAAR1 RO5203648 y RO5256390 en las propiedades reforzantes de la sacarosa utilizando programas de refuerzo fijo y progresivo.

Con el objetivo de estudiar la influencia del agonismo TAAR1 en la obtención de un reforzador natural, realizamos un estudio de autoadministración

en el que los animales recibían refuerzos de sacarosa. El ANOVA para cada uno de los compuestos se calculó utilizando como variables dependientes el número de

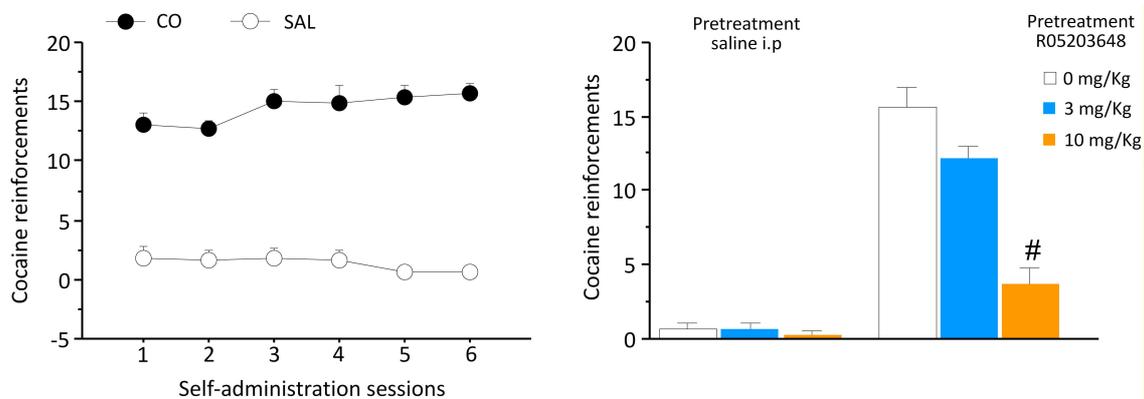


Figura 24: Efectos del compuesto R05203648 sobre la autoadministración de cocaína. Tras mostrar un historial consistente de consumo (izquierda) las ratas reciben un pretratamiento con diferentes dosis del R05203648. El consumo de cocaína se reduce de manera dependiente de la dosis tras la administración del R05203648 como pretratamiento. (#) indica diferente del valor del grupo cocaína.

palanqueos realizado durante las sesiones de entrenamiento y durante los tests de consumo y razón progresiva. Los resultados indicaron que durante el entrenamiento el grupo que recibiría el R05203648 no presentaba diferencias a lo largo de las sesiones, mientras que el grupo de ratas que posteriormente sería tratado con el R05256390 mostraba diferencias significativas entre las dos primeras sesiones y el resto, siendo las 4 últimas estables y no diferentes entre sí ($F_{5,25} = 1.682$, $p < 1.1757$) para el R05203648 y ($F_{5,35} = 3.918$, $p < 0.006$) para el R05256390). Los resultados de los test realizados con el R05203648 indicaron que el pretratamiento no redujo el consumo de sacarosa en los animales ($F_{2,10} = 3.825$, $p < 0.0584$), pero en cambio incrementó de manera dependiente de la dosis las propiedades reforzantes de la sacarosa en el test de razón progresiva ($F_{2,10} = 4.182$, $p < 0.0479$), siendo el efecto significativo tras la administración de la dosis alta (Newman Keuls, $p < 0.05$) (Figura 25 arriba). Para el R05256390, los datos indicaron que el pretratamiento con la dosis alta producía al mismo tiempo una

disminución en el consumo ($F_{2,14}= 42.553$, $p< 0.001$) y un incremento de las propiedades reforzantes de la sacarosa ($F_{2,14}= 3.851$, $p< 0.0465$) (Figura 25 abajo).

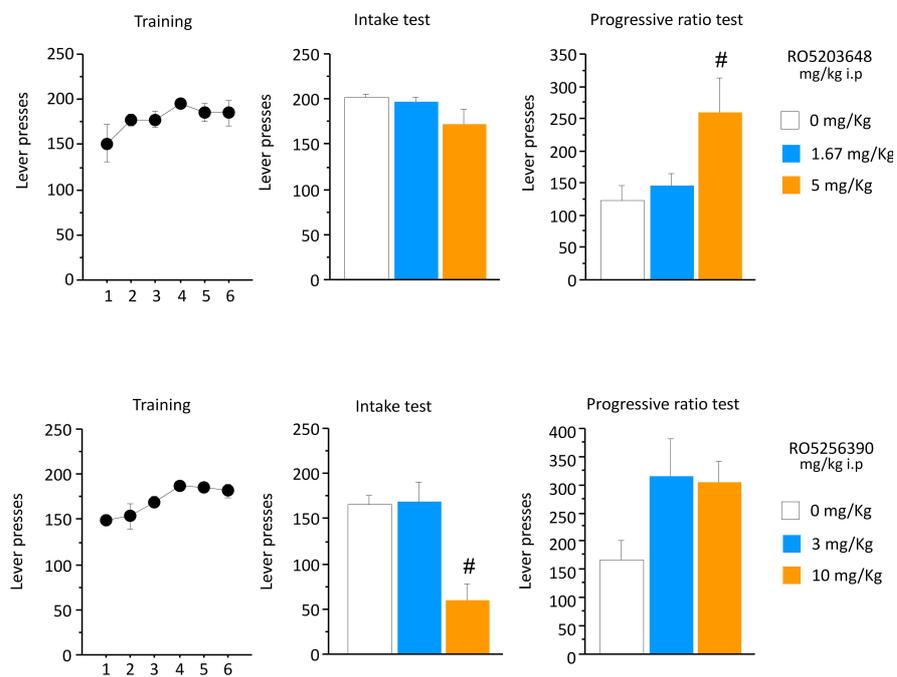


Figura 25: Resultados obtenidos de los test de consumo de sacarosa y Razón Progresiva bajo los efectos de los R05203648 y R05256390. Durante el entrenamiento no se observan grandes diferencias a lo largo de las sesiones. Bajo el efecto del R05203648 los animales no modifican las tasas de respuesta para obtener sacarosa en el test de consumo, en cambio sí que se observa un incremento dependiente de la dosis y significativo tras la administración de la dosis alta en el test de Razón progresiva (parte superior gráfica). Bajo los efectos del R05256390 (parte inferior) se observa tanto una reducción en el consumo como un incremento en las propiedades reforzantes de la sacarosa tras la administración de la dosis mayor.

DISCUSIÓN

A pesar de importantes esfuerzos centrados en el desarrollo de fármacos que pudieran ser de utilidad en el tratamiento la adicción a los psicoestimulantes, hasta la fecha no existen tratamientos disponibles que hayan demostrado eficacia para este grave trastorno. En el contexto de la adicción a otras sustancias, sin embargo, principalmente en los casos de la adicción a la nicotina y los opioides, diferentes tipos de terapias agonistas sustitutivas (i.e. metadona, buprenorfina, parches de nicotina, vareniclina) han mostrado una eficacia apreciable ayudando al mantenimiento de la abstinencia así como evitando el riesgo de recaída (Mattick et al, 2009; Stead et al, 2008). La perspectiva del uso de tratamientos sustitutivos se han basado principalmente en el uso de agentes que actuando sobre dianas biológicas similares a la droga de abuso, mostraran un menor potencial de abuso que ésta pero que son capaces de atenuar los efectos derivados de la abstinencia o incluso

En este contexto, en la presente tesis nos centramos en el estudio de varios compuestos, que por sus especiales características farmacocinéticas y farmacodinámicas hipotetizamos que podrían tener potencial terapéutico para el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes como la cocaína o derivados de la anfetamina.

1. Estudio sobre el potencial de abuso del AHN-1055 y de su influencia en el consumo de cocaína.

Los experimentos realizados en primer lugar fueron diseñados para caracterizar en ratas los efectos conductuales del análogo de la benzotropina, AHN 1-055, y obtener evidencias de su potencial como medicación sustitutiva de la adicción a la cocaína. Los datos presentados demuestran que el análogo tiene propiedades estimulantes, que aumenta la activación locomotora inducida por la cocaína y que asimismo reduce de forma efectiva la autoadministración de cocaína. Todo ello sin producir una fuerte motivación por su consumo ni búsqueda tras un período de abstinencia. En este sentido, el compuesto testado difiere en gran medida de la cocaína que produce tras su consumo una grave alteración de los procesos motivacionales y volitivos. La búsqueda de medicaciones agonistas de sustitución para la adicción a la cocaína se ha centrado en gran medida en

compuestos con alta afinidad con el DAT que atenuaran de forma efectiva los síntomas de la abstinencia y el ansia por la droga o *craving* (Gorelick et al, 2004; Grabowski et al, 1997). La aproximación de la terapia sustitutiva está basada en la idea de que un agonista competitivo con un inicio de acción más lenta y con efectos farmacológicos duraderos podría ser usada de forma efectiva para el tratamiento de la adicción a la cocaína. Esta estrategia terapéutica es usada para el tratamiento de la adicción a opiáceos, con la utilización de la metadona o la buprenorfina (Davids et al, 2004; Uchtenhagen, 2003).

Se han estudiado diferentes inhibidores de la recaptación del DAT en estudios clínicos controlados pero los resultados hasta la fecha han sido decepcionantes. El inhibidor de catecolaminas, metilfenidato (Ritalin®), no demostró mayor eficacia que el placebo en un estudio de doble ciego en individuos dependientes a la cocaína sin comorbilidad psiquiátrica (Grabowski et al, 1997), aunque sí que fue capaz de reducir el consumo de cocaína en pacientes ambulatorios que presentaban, además, trastorno de déficit de atención con hiperactividad (Levin et al, 2007). El GBR 12909 (vanoxerina), sin embargo, un derivado de la piperazina con alta afinidad por el DAT y con acciones antagonistas de los receptores nicotínicos ha mostrado resultados prometedores reduciendo el consumo de cocaína tanto en primates como en monos sin inducir mostrar efectos estimulantes comparables (Preti, 2000; Stafford et al, 2000). No obstante, este estudio con fue tenido que abortarse tras la aparición de efectos secundarios adversos como anomalías cardiacas: alteracion en los intervalos QTc, asociado con fuerte aumento del riesgo de padecimiento de arritmias. A pesar de estos problemas, el estudio y desarrollo de ligandos con alta afinidad al DAT con propiedades farmacocinéticas/dinámicas se sigue manteniendo como una línea prometedora que podría conducir al descubrimiento de medicaciones óptimas para la adicción a la cocaína (Rothman et al, 2008a). Aunque el AHN-1055 y el resto de análogos alogenados de la benzotropina fueron sintetizados por primera vez hace más de una década, su evaluación y estudio en modelos clínicamente relevantes ha sido limitado hasta la fecha. En los experimentos presentados, el AHN-1055 exhibe efectos conductuales consistentes con un perfil de una medicación sustitutiva para la adicción a la cocaína. En primer lugar, examinamos las características estimulantes y reforzantes del análogo en estudios de actividad

locomotora y de autoadministración. El AHN-1055 mostró efectos etimulatorios de forma dosis dependiente en la actividad locomotora. Estos resultados son consistentes con estudios previos publicados anteriormente en los que se utiliza un rango de dosis menor del análogo (Li *et al*, 2005). En los ensayos de interacción con la cocaína el AHN-1055 potenció el efecto estimulante agudo inducido por la cocaína. Estudios moleculares han indicado que la dopamina se une al DAT en un bolsillo enterrado entre los dominios transmembrana 1, 3, 6 y 8 (Beuming *et al*, 2008; Huang and Zhan, 2007), y que tanto estimulantes psicomotores, como la cocaína y la d-anfetamina, como análogos de la benzotropina, como el JHW-007 y el MFZ 2-71, se unen a un sitio de unión compartido con la dopamina (Beuming *et al*, 2008). Los resultados de estos estudios moleculares sugieren que la interacción competitiva entre la cocaína y el AHN-1055 en el DAT podría prevenir los efectos estimulantes de la cocaína. Los resultados presentados en esta tesis contradicen esta predicción, sugiriendo que el análogo no ocupa totalmente los lugares de unión del DAT en el cerebro de la rata a las dosis testadas.

Para comparar la eficacia reforzante del AHN-1055 con la de la cocaína, diseñamos un programa de razón progresiva modificado en el cual la demanda en la tarea se fue incrementando progresivamente a lo largo de varias sesiones de entrenamiento. El diseño de esta tarea experimental tuvo como objetivo tratar de minimizar los efectos acumulativos de las drogas que se pueden producir en una misma sesión, que habría podido llevar a posibles falsos negativos en los resultados. Este control fue particularmente crítico a la vista de los patrones de respuesta que muestran las ratas que se autoadministran el análogo, que es consistente con sus prolongados efectos. Mientras que las ratas que consumieron cocaína lo hicieron siguiendo pautas de consumo resistentes al progresivo y significativo aumento de los requerimientos de la tarea, aquellas ratas que se autoadministraban AHN-1055 cesaron de responder, siendo la exigencia para la obtención relativamente baja. Este hallazgo sugiere que la motivación para la búsqueda y el consumo del análogo es débil. En este sentido, el análogo claramente difiere de la cocaína, así como de otros compuestos con actividad sobre el DAT, incluyendo el GBR 12909 (Roberts, 1993) y el metilfenidato (Botly *et al*, 2008; Rush *et al*, 2001), y parece comportarse más como otros estimulantes psicomotores con menor eficacia reforzante como la cafeína (Briscoe *et al*, 1998) y

algunos análogos halogenados de la benzotropina (Lile *et al*, 2004; Woolverton *et al*, 2001). A pesar de este hecho, el AHN-1055 atenuó de forma dependiente de la dosis la autoadministración de cocaína. En particular, el análogo fue capaz de bloquear la autoadministración de cocaína a las mismas dosis que potenció la estimulación locomotora. Así pues, los presentes datos no parecen ser consistentes con la idea de que el AHN-1055 pueda simplemente antagonizar los efectos centrales de la cocaína. De hecho, los antagonistas de los receptores de dopamina inducen efectos opuestos en las tasas de respuesta en ratas que se autoadministran cocaína, produciendo una desviación de la curva dosis-respuesta hacia la derecha (Ahmed and Koob, 2004; Koob *et al*, 1987; Negus *et al*, 1996). Es más probable que, en vez de antagonizar los efectos de la cocaína, el análogo estuviera reduciendo la motivación para responder por cocaína en el procedimiento de autoadministración. Además, la reducción en el consumo de cocaína producido por el tratamiento con AHN-1055 fue específico de la droga. Las ratas tratadas con AHN-1055 mostraron una respuesta consistente y robusta en una tarea de respuesta operante por sacarosa, permitiendo este hecho excluir como factor responsable del efecto descrito un déficit motor generalizado o un déficit apetitivo importante. Estas características deseables del AHN-1055 han sido difíciles de mostrar en otros inhibidores del DAT de acción prolongada (Lile *et al*, 2004; Negus *et al*, 2009; Stafford *et al*, 2000). Asimismo, el descubrimiento de que el AHN-1055 no disminuye, sino que más bien aumenta la alta tasa de respuesta generada en la tarea operante por sacarosa, corrobora que el análogo difiere de otros estimulantes psicomotores clásicos, cuyos efectos en tareas operantes son en gran medida dependientes de la tasa de respuesta exigidos (Beecher and Jackson, 1976; Harris *et al*, 1978; Sanger *et al*, 1976). Además de mostrar una alta afinidad por el DAT, el AHN-1055 también bloquea los receptores muscarínicos M1. Futuros estudios son necesarios para estudiar la contribución potencial de dichos receptores en la modulación de los efectos de la cocaína por el AHN-1055. Sin embargo, las evidencias disponibles con otros análogos de la benzotropina con baja afinidad por receptores muscarínicos M1, como el JHW-007, sugieren que su actividad inhibidora del DAT podría ser suficiente para producir una alteración de los efectos conductuales relacionados con la acción de la cocaína (Hiranita *et al*, 2009). Una de las propiedades fundamentales de una droga o compuesto adictivo

es la gran dificultad que provoca en el consumidor en el mantenimiento de la abstinencia, que provoca que tras un periodo sin consumir la intensidad en la búsqueda de droga se incrementa, frecuentemente por la reexposición al contexto de consumo. Hasta la fecha no se habían utilizado este tipo de modelos preclínicos para testar el AHN-1055 o ningún otro inhibidor del DAT estructuralmente relacionado. En este caso, elegimos la utilización de un test de recaída inducido por la reexposición al contexto condicionado al consumo de droga tras un periodo de abstinencia forzada en vez otros modelos que utilizan la extinción previa de la conducta operante por su mayor validez aparente. Los resultados obtenidos fueron significativos. Las ratas que se autoadministraron cocaína exhibieron altas tasas de recaída, mientras que las ratas que se habían autoadministrado el análogo se comportaron como los animales controles, a pesar del hecho de que ambos grupos tuvieran el mismo historial de palanqueos. Este resultado es consistente con la baja eficacia reforzante del análogo. Hay que destacar que los dos grupos adicionales de ratas que fueron tratadas con AHN-1055 durante 4 días para reducir el consumo de cocaína mostraron, sin embargo, altas tasas de búsqueda de droga en el test de recaída. Estos datos muestran que un tratamiento a corto plazo con el análogo no produce una protección a largo plazo de la recaída. Sin embargo, el hallazgo de que la reexposición al contexto de consumo de AHN-1055 no induce ansia de consumo en los animales y por lo tanto recaída en la búsqueda de droga tras un período de consumo estable y un período subsecuente de abstinencia forzada aporta una importante evidencia de su bajo potencial de abuso y subraya su potencial para un posible tratamiento para el tratamiento de la recaída del consumo de cocaína mediante un tratamiento más prolongado.

2. Prevención de la recaída en el consumo de cocaína mediante un tratamiento sustitutivo con el AHN-1055

Para testar directamente la hipótesis de que esta clase de inhibidores atípicos del DAT podrían ser efectivos como tratamiento agonista sustitutivo para el tratamiento a los psicoestimulantes estudiamos en ratas consumidoras de

cocaína los efectos de diferentes tratamientos sustitutivos. Al reemplazar la cocaína disponible en las sesiones de autoadministración por otro psicoestimulante clásico, en este caso de acción prolongada, como la anfetamina, los animales sustituyeron el consumo de una sustancia por la otra y mantuvieron tasas estables de consumo de la droga sustituida. En contraste, cuando la cocaína fue reemplazada por AHN-1055 las ratas aumentaron la tasa de respuestas en las primeras sesiones de sustitución pero paulatinamente acabaron extinguiendo la conducta de autoadministración en las cajas operantes, de forma muy parecida a como lo hicieron las ratas control que recibieron vehículo. Al ser reexpuestos a la cocaína en un test de recaída, los animales que recibieron el tratamiento sustitutivo con el AHN-1055 mostraron niveles de búsqueda de droga significativamente menores que los animales control. Consistentemente, los animales que recibieron el tratamiento sustitutivo con el análogo mostraron una menor activación del mPFC (medida como expresión de proteína c-fos) tras la reexposición a la cocaína, así como niveles también significativamente menores en la expresión de BDNF y FADD. La reducción en la expresión de estas proteínas constituye un importante marcador biológico de la atenuación del ansia de consumo inducido por la reexposición a la cocaína.

Los resultados mostrados en el presente capítulo constituyen una demostración directa de que el tratamiento sustitutivo en el contexto del consumo de drogas mediante un inhibidor de la recaptura de dopamina con un bajo perfil de abuso puede llevar a la extinción de la conducta y lo que es más crítico, disminuir la vulnerabilidad a la recaída. Los datos indican además que esta resistencia se asocia con una menor reactividad a la reexposición a la cocaína en sujetos con experiencia previa de la droga, según se desprende por la expresión inducida por cocaína de c-Fos, BDNF y proteínas FADD en el mPFC durante el procedimiento de *reinstatement*.

Aunque muchos sistemas de neurotransmisión están mediando el efecto reforzante de los psicoestimulantes, los efectos de estas drogas sobre el sistema dopaminérgico se considera clave para que se produzca la transición de un uso recreativo de estas drogas a un consumo compulsivo. Los cambios en la transmisión dopaminérgica que ocurren durante y después de la exposición a la droga, se cree que contribuyen al efecto reforzante de la droga (Ritz *et al*, 1987;

Volkow *et al*, 1996b), la abstinencia (Rossetti *et al*, 1992) y la recaída (Volkow *et al*, 2006; Wang *et al*, 2012). No sorprende pues, que se haya hipotetizado que agentes con un alta afinidad por el DAT pudieran ser usados para suprimir la abstinencia y el ansia de droga, reduciendo así la vulnerabilidad recaer en el consumo (Gorelick *et al*, 2004; Rothman *et al*, 2008a). La estrategia comprende el uso de un agonista competitivo con un inicio de acción más lento y una vida media mayor que los de la cocaína. Aunque teóricamente es plausible, no existe hasta la fecha evidencia convincente que apoye esta idea. En adictos a la cocaína agonistas indirectos del DAT como la amantadita, la bromocriptina y la pergolida se han mostrado ineficaces promoviendo la adherencia al tratamiento y a la abstinencia del consumo de cocaína (Soares *et al*, 2003). En algunos ensayos controlados con adictos a la cocaína se han utilizado drogas con alto potencial de abuso como la dexanfetamina (Grabowski *et al*, 2001; Shearer *et al*, 2003) y metanfetamina (Mooney *et al*, 2009), mostrando efectividad en la reducción del consumo de cocaína y en el ansia subjetiva de su consumo (*craving*). Sin embargo, otro compuesto derivado de la anfetamina como el metilfenidato, ha mostrado ser inefectivo en la reducción del consumo de cocaína en estudios previos (Grabowski *et al*, 1997), un déficit que podría estar relacionado con su capacidad de inducir disforia en adictos a la cocaína (Roache *et al*, 2000). La vanoxerina (GBR-12909), un derivado de la piperazina con alta afinidad por el DAT, como se ha comentado anteriormente ha llegado a ser testada en fase II en ensayos clínicos con adictos a la cocaína pero su desarrollo fue detenido debido a efectos secundarios indeseados. Aunque existe la esperanza de que nuevos derivados y análogos con acciones selectivas sobre el DAT pudieran remediar estos problemas, es importante señalar que ni el GBR-12909, que reduce el consumo de cocaína en humanos, monos y ratas (Prete, 2000; Skjoldager *et al*, 1993; Tella, 1995) ni ningún otro inhibidor de la recaptación de dopamina de acción prolongada, ha demostrado efectividad específica reduciendo la vulnerabilidad a la recaída ni en animales ni en humanos.

En este estudio usamos de nuevo el AHN-1055, un derivado de la benzotropina que muestra una alta afinidad por el DAT ($K_i = 11.8$ nM) y por los receptores muscarínicos M1 ($K_i = 11.6$) (Agoston *et al*, 1997), y las características farmacodinámicas y farmacocinéticas típicas de otros análogos creados mediante

la sustitución del grupo N, incluyendo un inicio de acción y pico de acción farmacológico más lento, y una vida media más larga (Raje *et al*, 2005). Además, el AHN-1055 muestra características deseables para un compuesto que tiene como finalidad el tratamiento de la adicción, como es la habilidad de bloquear la preferencia condicionada de lugar inducida por cocaína y anfetamina (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b), así como su consumo en procedimientos de autoadministración en ratas como se ha mostrado en los resultados mostrados en el capítulo 1 de los resultados (Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009). Además el AHN-1055 muestra una baja eficacia reforzante comparada con la cocaína y no genera niveles significativos de recaída inducida por contexto tras un período de abstinencia forzado (Ferragud *et al*, 2009). Con el objetivo de testar la hipótesis de que un tratamiento sustitutivo podría proteger a largo plazo de la recaída, nos basamos en las características neuroquímicas y conductuales del AHN-1055. Desde la introducción de los tratamientos sustitutivos rápidamente emergieron diferencias entre los diferentes grupos experimentales. La respuesta ante la administración de la dosis baja de AHN-1055 se incrementó desde el comienzo del procedimiento sustitutivo, sugiriendo que el fármaco produce algunos efectos psicoactivos. Sin embargo, la eficacia reforzante del tratamiento sustitutivo fue probablemente baja ya que a medida que las sesiones progresaban, la respuesta en los dos grupos experimentales para obtener AHN-1055 disminuyó en la misma medida que lo hicieron el grupo sustituido por salino. La débil eficacia reforzante que mostró el análogo en el presente procedimiento es consistente con las evidencias previamente obtenidas en el capítulo anterior (Ferragud *et al*, 2009). Además de mostrar que las propiedades del AHN-1055 son distintas a las de los psicoestimulantes típicos, confirmamos que el grupo que recibió anfetamina durante el procedimiento de sustitución continuó respondiendo consistentemente a lo largo del procedimiento de sustitución, al contrario que lo hicieron los grupos tratados con AHN-1055.

Los grupos que sustituyeron por salino o por AHN-1055 fueron comparables en términos de niveles de respuesta en la palanca activa hacia el final del entrenamiento sustitutivo. Sin embargo, la respuesta a la cocaína tras el tratamiento difirió radicalmente en el test de *reinstatement*. Introdujimos un grupo

yoked para controlar el posible efecto de la extinción operante del palanqueo durante la sustitución. Comparado con el tratamiento con salino la terapia sustitutiva con el análogo produjo una disminución de la capacidad de la cocaína para inducir un *reinstatement* de la conducta de búsqueda de droga. Además, los resultados mostrados por el grupo *yoked* mostraron que el consumo voluntario del sustituto y la extinción de la respuesta de palanqueo no fue necesaria para que el tratamiento sustitutivo surtiera efecto atenuando la inducción del *reinstatement* por la cocaína durante el test. De esta forma, la administración pasiva del tratamiento sustitutivo en el contexto de consumo de droga permitió una protección duradera sobre la recaída. Una posibilidad es que el tratamiento sustitutivo produjera la extinción de señales interoceptivas asociadas con la abstinencia de cocaína, las cuales se piensa que son adquiridas durante la exposición a la droga y que son en gran medida responsables del ansia de droga o *craving* (Gray and Critchley, 2007). Esta idea es consistente con evidencias recientes que muestran que la administración repetida y no contingente de cocaína disociada del consumo activo puede disminuir la intensidad de búsqueda de droga en un procedimiento de *reinstatement* mediante la extinción de las claves interoceptivas asociadas al consumo (Mihindou *et al*, 2011). Estudios adicionales estudiando los efectos terapéuticos del análogo en un contexto diferente al habitual serían necesarios para establecer si los efectos observados son específicos del contexto

Además, estudiamos la expresión de diferentes proteínas para obtener una medida de la actividad y de los cambios adaptativos en el mPFC asociados con los efectos del tratamiento sustitutivo. Tanto la PrLC como la Cg1 son elementos centrales en los circuitos que median el *craving* y la búsqueda de droga. Estudios previos han mostrado que mediante la inactivación de la PrLC es posible bloquear la recaída inducida por la reexposición a la cocaína en un procedimiento de autoadministración. Este efecto preventivo de la recaída se ha demostrado también cuando ésta es provocada por señales condicionadas (Capriles *et al*, 2003; McLaughlin and See, 2003). Las vías activadas durante la recaída en la búsqueda de cocaína podrían estar segregadas en la mPFC, siendo la corteza infralímbica la que estuviera mediando los efectos supresores tras la extinción y la corteza PrLC y la Cg1 las responsables de disparar la motivación para consumir droga, al ser el

sujeto reespuesto a ella, por medio de las proyecciones de Cg1 al NAcc (Kalivas *et al*, 2003a; Peters *et al*, 2009).

El *priming* de cocaína durante el test de recaída aumentó la expresión de c-Fos, BDNF y de proteínas FADD en el área PrLC/Cg1 en ratas que recibieron sustitución por salino y mostraron una fuerte recaída, siendo este efecto sólo presente en ratas sin experiencia previa. Este hallazgo sugiere que la inducción de c-Fos, BDNF y de proteínas FADD en el mPFC podrían asociarse con la recaída inducida por cocaína, pero también con una sensibilidad especial a la cocaína. La activación de c-Fos y de genes de expresión temprana en el mPFC se ha evidenciado tanto tras la inducción de la recaída por claves como por la reposición a la droga (Ciccocioppo *et al*, 2001; Ziolkowska *et al*, 2011), lo cual podría indicar una actividad funcional del mPFC durante la recaída. La administración de cocaína eleva la expresión de BDNF en diferentes áreas cerebrales, incluyendo el mPFC. Esta proteína se ha sido propuesta como el responsable de la eficacia sináptica y plasticidad que están a la base del trastorno adictivo (McGinty *et al*, 2010). Asimismo, la reexposición al contexto de consumo y la subsecuente recaída en ratas consumidoras se ha mostrado previamente que aumenta mRNA BDNF en el mPFC (Hearing *et al*, 2008). Tras un período de abstinencia a la cocaína, incrementos de BDNF en la mPFC contribuyen a la potenciación a largo plazo, sensibilizando las sinapsis excitatorias en esta región y contribuyendo a la sensibilización conductual y reactividad a la droga (Lu *et al*, 2010). De acuerdo con estos resultados, nuestros datos sugieren que la sustitución con un inhibidor de la captura de DA después del consumo de cocaína, reduce la expresión de BDNF inducida por la droga en la mPFC de ratas que presentan una menor reactividad a la droga y susceptibilidad a la recaída. Finalmente, la inducción de FADD por la administración de cocaína se mostró inhibida en ratas que recibieron el tratamiento sustitutivo con el análogo. A pesar de que el papel principal de FADD es proapoptótico, existen evidencias que sugieren que esta proteína podría ser responsable en parte de la plasticidad sináptica inducida por cocaína (Alvaro-Bartolome *et al*, 2011; Garcia-Fuster *et al*, 2009; Garcia-Fuster *et al*, 2011). Los resultados presentados muestran, además, que la cocaína induce la expresión de proteína FADD en la mPFC de ratas con una aparente falta de conversión de esta proteína a sus forma fosforilada (Alvaro-Bartolome *et al*, 2011; Garcia-Fuster *et al*,

2009; Garcia-Fuster *et al*, 2007). Es importante señalar que niveles basales elevados de FADD en ratas se han relacionado con alta sensibilización y una mayor propensión a autoadministrarse cocaína (Garcia-Fuster *et al*, 2009). En línea con estas observaciones nuestros datos muestran como el tratamiento sustitutivo con el análogo reduce la elevación de los niveles de FADD en la mPFC inducidos por cocaína, lo cual se relaciona con una susceptibilidad reducida a la recaída inducida por la droga. Considerando el conjunto de los datos, y reconociendo que la evidencia neuroquímica presentada es sólo correlacional, los llamativos cambios en la expresión de proteínas inducidos por cocaína durante la recaída sugieren claramente que la terapia sustitutiva disminuye la reactividad a la droga a nivel de la mPFC, reduciendo asimismo el *craving* y la vulnerabilidad a la recaída.

En resumen, los resultados de este capítulo proporcionan evidencias de que un inhibidor atípico de la recaptación de dopamina de acción prolongada como lo es el AHN-1055, puede reducir de forma efectiva la vulnerabilidad a la recaída tras un período de terapia sustitutiva en el contexto de consumo de la droga.

3. Estudio sobre el potencial de abuso del inhibidor del transportador de dopamina, JHW-007 y de su influencia en el consumo de metanfetamina.

El objetivo general del estudio expuesto en el capítulo 3 de los resultados fue caracterizar la capacidad del JHW-007, un inhibidor atípico de la captura de DA, en una variedad de modelos animales de adicción a la METH. Los objetivos específicos fueron, en primer lugar determinar la capacidad del análogo para alterar la actividad locomotora inducida por METH y en segundo lugar, estudiar los efectos moduladores del JHW-007 sobre los efectos reforzantes de la droga, mediante tests de consumo y de motivación (ratio progresivo). Los resultados mostraron que el JHW-007 atenuó de forma dosis dependiente la estimulación locomotora inducida por la METH y el consumo de la droga, pero no de sacarosa, en ratas con un historial estable de consumo. Asimismo, bajo los efectos del JHW-007, los animales incrementaron el *breaking point* tanto para la obtención de droga como de sacarosa.

El abuso de METH continua siendo un problema grave en muchos países. Las medicaciones utilizadas en la actualidad para tratar la adicción a los psicoestimulantes son no son medicaciones diseñadas específicamente para este trastorno y contribuyen, en el mejor de los casos, sólo a atenuar algunos de los síntomas asociados con la abstinencia, como la depresión o la anhedonia. La METH, al igual que la anfetamina, ejerce parte de sus efectos activando vías del sistema noradrenérgico, pero se ha reconocido que sus acciones estimulantes y recompensantes de deben principalmente a sus interacciones sobre el sistema dopaminérgico, especialmente sobre el DAT (Fleckenstein *et al*, 2007; Goodwin *et al*, 2009; Sofuoglu and Sewell, 2009).

Evidencias recientes sugieren el posible potencial de estos análogos de la BZT como farmacoterapia para el abuso de psicoestimulantes. Además de tener un bajo potencial de abuso, estos derivados de la BZT presentan una elevada afinidad por el DAT, una lenta penetración a través de la barrera hemoatoencefálica y una mayor duración de sus efectos farmacológicos (Katz *et al*, 2004; Rajé *et al*, 2003; Rajé *et al*, 2005). Algunos de estos análogos como el AHN-1055 y el JHW-007 son capaces de antagonizar efectos comportamentales inducidos por psicoestimulantes clásicos como la cocaína o anfetamina, mostrando débiles propiedades estimulantes, recompensantes y reforzantes por sí mismos en diferentes modelos animales de adicción (Desai *et al*, 2005a; Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a; Velazquez-Sanchez *et al*, 2012; Velazquez-Sanchez *et al*, 2011; Velazquez-Sanchez *et al*, 2013).

En este trabajo, los resultados indican que un pretratamiento con JHW-007 bloquea de forma dosis dependiente la estimulación locomotora inducida por METH, sin mostrar ningún efecto estimulante por sí mismo. Los análogos de la BZT muestran grados de similaridad con estimulantes como la cocaína en ensayos de locomoción y de discriminación de drogas. Como se muestra en el capítulo 1 de la tesis, otro de los análogos, el AHN-1055, a diferencia del JHW-007, exhibe un débil efecto estimulante en ratas cuando es administrado solo e incrementa el efecto estimulante inducido por la cocaína cuando fue administrado en combinación (Ferragud *et al*, 2009), a pesar de mostrar una débil eficacia reforzante en comparación con la de la cocaína (Ferragud *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*,

2012). La atenuación producida por el JHW-007 sobre los efectos estimulantes inducidos por la METH no puede ser explicada por la presencia de comportamientos estereotipados que pudieran estar interfiriendo con la tarea. Trabajos previos han mostrado que análogos de la BZT, entre los que se encuentran el AHN-2005, AHN-1055 y el JHW 007, inducen tenues o nulos efectos estimulantes sobre la actividad locomotora y sobre la inducción de estereotipia motoras cuando se administraron solos y que no potencian las estereotipias inducidas por cocaína cuando se administran en combinación (Li *et al*, 2013; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009). Estos resultados son, por tanto, consistentes con las limitadas propiedades estimulantes de los análogos, y, en lo que concierne al JHW-007, con su capacidad para funcionar como un antagonista psicoestimulante (Desai *et al*, 2005b; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a). Este perfil antagonista está relacionado con una rápida asociación entre el análogo y el DAT, seguida de una asociación más lenta (Desai *et al*, 2005b; Kopajtic *et al*, 2010). Inhibidores atípicos de la captura de DA, como el JHW-007, muestran unas limitadas capacidades estimulantes debido presumiblemente a su capacidad de interaccionar con el DAT en una conformación cerrada, mientras que la cocaína y sus análogos prefieren la interacción cuando la conformación es abierta (Beuming *et al*, 2008). Además, el JHW-007 ha mostrado la capacidad de desplazar el equilibrio del transportador desde una conformación abierta a una cerrada, reduciendo, de esta forma, la afinidad de los psicoestimulantes clásicos por el transportador y contribuyendo a antagonizar sus efectos psicofarmacológicos (Loland *et al*, 2008).

Confirmando nuestra hipótesis, el JHW-007 produjo en los experimentos descritos en este capítulo un desplazamiento hacia abajo de la curva dosis-respuesta en la autoadministración de METH. Esta observación es consistente con trabajos previos, incluido los estudios presentados en el capítulo 1 de esta tesis, que muestran una reducción del consumo de cocaína y anfetamina al administrar un pretratamiento con este tipo de análogos de la BZT (Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2011). Este decremento de la tasa autoadministración de metanfetamina fue alcanzado a dosis que no alteraron la conducta operante para la obtención de sacarosa, pudiéndose excluir así que los sujetos mostraran deficiencias motoras o motivacionales que estuvieran interfiriendo sobre la dicha conducta de forma inespecífica. Una posible

interpretación de estos resultados podría ser que la habilidad del JHW-007 para atenuar la autoadministración de METH es debida a sus efectos antagonistas disminuyendo la eficacia reforzante de la droga. Sin embargo, esta conclusión no puede garantizarse completamente con los resultados obtenidos. Dos dosis de metanfetamina fueron testadas, 0.04 y 0.12 mg/kg/infusión, que generaron altas tasas de respuesta y un consumo total de droga por sesión similar. Las dos dosis de METH seleccionadas, se encuentran en el tramo ascendente y descendente, respectivamente, de la curva dosis-respuesta de metanfetamina (Beckmann *et al*, 2012), siendo la dosis alta la que produce tasas de respuesta más bajas. Un pretratamiento puede tener diferente efectos al variar el rango de dosis de la droga autoadministrada (Mello *et al*, 1996). Por ejemplo, si la curva dosis-respuesta se desplaza hacia la derecha, el pretratamiento podría estar ejerciendo efectos antagonistas. Por el contrario, si la curva dosis-efecto se desplaza hacia la izquierda, la sustancia administrada como pretratamiento podría estar incrementando los efectos reforzantes de dicha droga. La administración de metilfenidato combinado con cocaína, por ejemplo, desplaza la curva hacia la izquierda (Hiranita *et al*, 2009). Resultados similares han sido obtenidos con otros inhibidores de la captura de DA y compuestos estimulantes, como el GBR 12909, la d-anfetamina y el análogo de la cocaína WIN 35,428 (Barrett *et al*, 2004; Schenk, 2002). Otra posibilidad que podríamos contemplar sería que el pretratamiento indujera una atenuación de la curva dosis-respuesta (hacia abajo). Este patrón de respuesta es el que se ha observado tras la administración de análogos de la BZT, como AHN 2-005, AHN 1-055 y JHW-007 como pretratamiento antes de la sesión de autoadministración de cocaína (Hiranita *et al*, 2009). Es por tanto, que estas moléculas parecen comportarse como agonistas o antagonistas en función de la dosis de la droga autoadministrada. Los presentes resultados se limitaron a dos dosis de METH y e indicaron una eficacia mayor en la reducción de las tasas de respuesta a las dosis altas, lo que no sería consistente con un perfil antagonista del JHW-007 sobre los efectos reforzantes de la droga.

En el caso en el que el JHW-007 estuviera antagonizando los efectos reforzantes de la METH deberíamos haber observado un incremento en la tasa de respuestas al menos con la dosis alta (Mello *et al*, 1996), lo que no constituye una característica deseable para una potencial medicación que pudiera ser utilizada en

la clínica. Los resultados obtenidos en los presentes experimentos han evidenciado que el JHW-007 no actúa como antagonista en el contexto de la autoadministración bajo programas de refuerzo de PR. El pretratamiento con el análogo produjo un incremento del número de respuestas que los animales realizaron para obtener la droga a las dos dosis de METH testadas. Un incremento similar de la eficacia reforzante fue observado en los animales que respondían por sacarosa. Estudios previos con el análogo de la cocaína RTI 111, un análogo 3-feniltropano con alta afinidad por el DAT, NET y SERT, así como efectos estimulantes, produjo en monos un desplazamiento de la curva hacia la izquierda y hacia abajo en la curva dosis-respuesta para METH bajo programas de PR. Los autores sugirieron que el RTI 111 produce un incremento en la potencia reforzante de la droga cuando ambas se administran de forma combinada (Ranaldi *et al*, 2000). Al igual que incrementos en la dosis de los estimulantes en paradigmas de autoadministración elevan el *breaking point* en programas de PR (Richardson *et al*, 1996), sería de esperar que manipulaciones con agentes dopaminérgicos incrementaran también esta variable para la autoadministración de psicoestimulantes. El JHW-007 produjo un aumento del *breaking point* para los animales que respondieron tanto para la obtención de METH como de sacarosa, sugiriendo que el análogo podría estar incrementando las propiedades de incentivo tanto de refuerzos naturales como de la droga. Este aspecto podría derivarse de la moderada elevación del tono dopaminérgico basal inducido por el JHW-007.

En conjunto, los resultados obtenidos han mostrado los efectos inhibitorios sobre la actividad locomotora inducida por la METH y sobre la autoadministración producidos por el del JHW-007 son más consistentes con un incremento de las propiedades reforzantes de la droga. El uso de un agente sustitutivo que reemplace el uso de la droga de abuso continúa constituyendo una aproximación válida y racional para el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes. Aunque el JHW-007 parece incrementar la potencia de la METH y podría exacerbar, por tanto, su potencial de abuso, también muestra bajo potencial de abuso por sí mismo en varios modelos animales de adicción y podría mostrar efectividad terapéutica facilitando la reducción del consumo de METH o el mantenimiento de la abstinencia. Los presentes resultados aportan evidencias que justifican el interés en esta perfil de inhibidores atípicos de la recaptura de DA y justifican estudios

adicionales que ayuden a esclarecer sus mecanismos de acción específicos así como su potencial terapéutico para el tratamiento de la adicción a la psicoestimulantes.

4. Agonistas TAAR1 y psicoestimulantes

A pesar de que estudios previos habían relacionado el abuso de drogas, al igual que otros trastornos neuropsiquiátricos con una alteración de los niveles de aminas de traza (TAs) (Berry, 2007; Burchett *et al*, 2006; Grandy, 2007) hasta la fecha esta relación se había considerado como inespecífica, debido a la ausencia de receptores específicos. La identificación del TAAR1 ha cambiado esta perspectiva (Borowsky *et al*, 2001; Bunzow *et al*, 2001; Lindemann *et al*, 2005a; Sotnikova *et al*, 2009) y ha generado gran expectativas en el contexto de la neurofarmacología de la adicción. Sin embargo, el potencial de esta diana farmacológica como herramienta eficaz para la prevención o tratamiento de los efectos nocivos de las drogas de abuso esta por elucidar. Con el objetivo de realizar una aproximación al papel de este nuevo sistema y de sus efectos de las drogas de abuso se realizaron los experimentos presentados en el último capítulo de la presente tesis.

En primer lugar mostramos como la activación selectiva del TAAR1 tanto parcial como total mediante los agonistas R05203648 y R0526390 respectivamente, no induce efectos estimulantes contrariamente a como se ha observado en otros agonistas no selectivos (p.e.: PEA). De forma significativa los fuertes efectos estimulantes de la metanfetamina son bloqueados de forma dosis dependiente mediante la activación de dicho receptor. Además, mostramos como agonista R05106017 es capaz de atenuar significativamente los efectos estimulantes inducidos por la cocaína en ratones, a pesar de que no bloquear completamente los efectos condicionados de incentivo, mediante un paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar inducida por cocaína. De forma muy significativa la administración del agonista parcial TAAR1, R05203648, reduce la

autoadministración de cocaína en animales con consumo estable. Este fármaco fue altamente eficaz reduciendo el consumo de cocaína a dosis que sin embargo, fueron inocuas sobre la conducta operante para la obtención de sacarosa.

El diseño y síntesis del agonistas parcial R05203648 así como de los agonistas totales R05203648 y R05106017 nos ha permitido explorar directamente por primera vez los efectos del agonismo parcial/total sobre este receptor en la autoadministración de cocaína y en el condicionamiento de preferencia de lugar inducida por esta droga. Estos agonistas muestran una alta afinidad y potencia sobre el TAAR1 y un alta especificidad respecto a otros receptores monoaminérgicos (Revel *et al*, 2011; Revel *et al*, 2012b) y transportadores como el DAT, SERT o NERT, además de unas propiedades farmacocinéticas favorables para su uso in vivo. Estas propiedades contrastan con los agonistas disponibles hasta el momento, como la iodotironamina (Panas *et al*, 2010).

Estudios previos han mostrado que la activación de TAAR1 tiene gran influencia sobre la transmisión dopaminérgica y es capaz de reducir ciertos efectos inducidos por estimulantes. Por una parte, evidencias basadas en trabajos con ratones mutantes *Taar1-ko* mostraron tasas de disparo espontáneas considerablemente más elevadas que controles en neuronas dopaminérgicas en el VTA (Lindemann *et al*, 2008) sugiriendo que el TAAR1 es tónicamente activo y que mediante esta constante actividad regula a la baja la frecuencia de disparo dopaminérgica. Consistentemente con este trabajo, los agonistas endógenos p-tiramina y los agonistas selectivos R05166017 y R05256390 reducen la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Lindemann *et al*, 2008; Revel *et al*, 2011). En contraste, los antagonistas selectivos EPPTB y los agonistas parciales R05203648 and R05263397 produjeron un aumento en la frecuencia basal de disparo de estas neuronas dopaminérgicas (Bradaia *et al*, 2009; Revel *et al*, 2012b). Existe evidencias que sugieren que la activación de TAAR1 puede modular la potenciación de la transmisión dopaminérgica inducida por estimulantes psicomotores. Ratones *taar1* knockouts mostraron una potenciación en la elevación de la DA extracelular en el estriado inducida por anfetamina respecto a animales *wild type* así como en la estimulación locomotora.

Contrariamente, animales en los que se sobreexpresó el TAAR1 mostraron ser hiposensibles a la anfetamina en sendos parámetros (Lindemann *et al*, 2008).

Dado la localización propuesta del TAAR1 en sinápsis monoaminérgicas, la activación parcial de este receptor por la DA o la 5-HT no puede descartarse. La actividad de en este receptor resultaría en la unión competitiva de varios ligandos del TAAR1 correspondientes a su concentración local formando mecanismos complejos de feedback autoregulatorios en neuronas monoaminérgicas que expresan TAAR1. Se ha postulado para estos receptores una función moduladora de la actividad dopaminérgica a través de una interacción funcional con los transportadores de DA y con los receptores D2 (Bradaia *et al*, 2009; Lindemann *et al*, 2008; Miller, 2011; Wolinsky *et al*, 2007; Xie *et al*, 2007a).

Los agonistas parciales pueden actuar como agonistas netos o antagonistas dependiendo del nivel de activación endógena del receptor y de los niveles de neurotransmisores del entorno, razón por la que han sido denominados también “estabilizadores” (Carlsson *et al*, 2004; Mailman and Murthy, 2010; Stahl, 2001). Los agonistas empleados en los experimentos presentados en este capítulo, bloquearon en roedores la estimulación locomotora inducida por la administración de tanto cocaína como metanfetamina, sin producir por sí mismo ningún efecto en esta variable. Este perfil difiere significativamente de la feniletilamina, TA que es capaz de inducir una hiperactividad similar a la inducida por la anfetamina. El hecho de que el agonista parcial R05166017 sea capaz de suprimir la hiperlocomoción en ratones carentes de DAT, sugiere que el transportador de DA no es necesario para inducir los efectos del TAAR1 sobre las funciones relacionadas con la DA.

Estos experimentos han permitido determinar que el R05203648 es además capaz de atenuar la autoadministración de cocaína en ratas con un historial estable de consumo, propiedad que contrasta con los efectos que tienen la administración de otros psicoestimulantes, que generalmente incrementan el consumo de droga (Koob *et al*, 1987; Negus *et al*, 1996), sugiriendo un modo de acción distinto. Además, los efectos sobre el consumo de sacarosa permiten descartar que los efectos observados sobre el consumo de cocaína se deban a la inducción de una disfunción motora o motivacional general.

Los resultados obtenidos con este conjunto de agonistas TAAR1, permiten mantener e reavivar el interés de los TAAR1 como dianas biológicas para el desarrollo de tratamientos para trastornos en los que la transmisión dopaminérgica es aberrante, como ocurre en el caso de la adicción a psicoestimulantes como la cocaína o la metanfetamina. El “efecto tampón” o estabilizador de la transmisión que se ha observado en estudios previos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, como algunos de los mostrados en la presente tesis, subrayan dicho potencial, tanto para atenuar la hiperactivación tras la ingesta aguda de la droga, como para posiblemente para atenuar los efectos de la abstinencia y reducir la probabilidad de recaída en sujetos adictos. Pero este extremo es mera especulación. Futuros estudios serán necesarios para establecer los mecanismos específicos de estos receptores y de su interrelación con los sistemas monoaminérgicos así como de su eficacia para la prevención del abuso de este tipo de drogas a largo plazo.

in en este resultados sugieren un potencial terapéutico de estos agonistas TAAR1 en el tratamiento del abuso de psicoestimulantes y dejan la puerta abierta para futuros estudios que permitan comprender como estos receptores antagonizan algunos de los efectos inducidos por los psicoestimulantes.

Los datos presentados apoyan la idea de que el desarrollo de fármacos que actúen sobre el DAT y que muestren poco potencial de consumo podrían ser efectivos para el tratamiento de la adicción a la cocaína.

CONCLUSIONES

- 1.- El tratamiento con AHN-1055 tiene efectos estimulantes y potencia los efectos estimulantes de la cocaína cuando ambas drogas son coadministradas.
- 2.- El AHN-1055 muestra una débil eficacia reforzante comparado con la cocaína en un programa de refuerzo progresivo.
- 3.- El AHN-1055 bloquea de forma dosis-dependiente la autoadministración de cocaína sin afectar al consumo de sacarosa.
- 4.- En animales con un historial de consumo estable de AHN-1055 no se produce una fuerte recaída de búsqueda de droga tras dos semanas de abstinencia, contrariamente a lo que se produce tras un historial comparable de consumo de cocaína.
- 5.- A diferencia de lo que ocurre cuando la cocaína es sustituida por otros psicoestimulantes de acción prolongada, el tratamiento sustitutivo con AHN-1055 produce la extinción del consumo de droga en ratas con una historia estable de autoadministración de cocaína.
- 6.- El tratamiento sustitutivo con AHN-1055 reduce considerablemente la recaída de búsqueda de droga inducida por una reexposición a la cocaína.
- 7.- El patrón de expresión de proteínas en la corteza prefrontal medial es análogo a los efectos conductuales de búsqueda de droga en el test de recaída. I.e.: el tratamiento sustitutivo con AHN-1-055 bloquea el incremento en la expresión de c-fos, BDNF y FADD inducido por cocaína.
- 8.- El JHW-007 no produce efectos estimulantes por sí mismo.

9.- El JHW-007 atenúa de forma dosis-dependiente la estimulación locomotora inducida por la metanfetamina.

10.- El JHW-007 reduce el consumo de metanfetamina sin afectar el consumo de sacarosa.

11.- El JHW-007 incrementa la eficacia reforzante tanto de la metanfetamina como de la sacarosa.

12.- El agonismo total del TAAR-1, mediante el R05106017, inhibe la estimulación locomotora inducida por cocaína, pero no el condicionamiento de preferencia de lugar.

13.- El agonismo parcial del TAAR1, mediante el compuesto R05203648, reduce el consumo de cocaína de manera dependiente de la dosis en ratas con historial estable de consumo.

14.- Tanto el agonismo total como parcial del TAAR1 mediante los compuestos R05203648 y R05203648, respectivamente, que carecen de efectos cuando son administrados solos, reducen los efectos estimulantes inducidos por metanfetamina.

15.- El agonismo del TAAR-1 mediante los compuestos R05203648 y R05203648 incrementan la eficacia reforzante de la sacarosa utilizando programas de refuerzo fijo y progresivo.

BIBLIOGRAFÍA

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

Agoston GE, Wu JH, Izenwasser S, George C, Katz J, Kline RH, *et al* (1997). Novel N-substituted 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]tropane analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *Journal of medicinal chemistry* **40**(26): 4329-4339.

Ahmed SH, Koob GF (1998). Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science* **282**(5387): 298-300.

Ahmed SH, Koob GF (2004). Changes in response to a dopamine receptor antagonist in rats with escalating cocaine intake. *Psychopharmacology (Berl)* **172**(4): 450-454.

Alvaro-Bartolome M, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, Garcia-Sevilla JA (2011). Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. *Neuroscience* **196**: 1-15.

Anderson AL, Reid MS, Li SH, Holmes T, Shemanski L, Slee A, *et al* (2009). Modafinil for the treatment of cocaine dependence. *Drug and alcohol dependence* **104**(1-2): 133-139.

Anton RF, O'Malley SS, Ciraulo DA, Cisler RA, Couper D, Donovan DM, *et al* (2006). Combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence: the COMBINE study: a randomized controlled trial. *JAMA* **295**(17): 2003-2017.

APA (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.)* American Psychiatric Association.

Asghar SJ, Tanay VA, Baker GB, Greenshaw A, Silverstone PH (2003). Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers. *Human psychopharmacology* **18**(4): 291-299.

Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Tang XC, Toda S, *et al* (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nature neuroscience* **6**(7): 743-749.

Baker DA, Tran-Nguyen TL, Fuchs RA, Neisewander JL (2001). Influence of individual differences and chronic fluoxetine treatment on cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* **155**(1): 18-26.

Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW (2002). The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(20): 9134-9141.

Baker LE, Riddle EE, Saunders RB, Appel JB (1993). The role of monoamine uptake in the discriminative stimulus effects of cocaine and related compounds. *Behavioural pharmacology* **4**(1): 69-79.

Barak LS, Salahpour A, Zhang X, Masri B, Sotnikova TD, Ramsey AJ, *et al* (2008). Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Molecular pharmacology* **74**(3): 585-594.

Barrett AC, Miller JR, Dohrmann JM, Caine SB (2004). Effects of dopamine indirect agonists and selective D1-like and D2-like agonists and antagonists on cocaine self-administration and food maintained responding in rats. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 256-273.

Battaglia G, Monn JA, Schoepp DD (1997). In vivo inhibition of veratridine-evoked release of striatal excitatory amino acids by the group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in rats. *Neuroscience letters* **229**(3): 161-164.

Baumann MH, Ayestas MA, Dersch CM, Brockington A, Rice KC, Rothman RB (2000). Effects of phentermine and fenfluramine on extracellular dopamine and serotonin in rat nucleus accumbens: therapeutic implications. *Synapse* **36**(2): 102-113.

Beckmann JS, Denehy ED, Zheng G, Crooks PA, Dwoskin LP, Bardo MT (2012). The effect of a novel VMAT2 inhibitor, GZ-793A, on methamphetamine reward in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **220**(2): 395-403.

Beecher MD, Jackson DE (1976). Rate-dependent effect of amphetamine in rats: extension to between-subjects effect. *Psychopharmacologia* **46**(3): 307-309.

Beresford TP, Clapp L, Martin B, Wiberg JL, Alfors J, Beresford HF (2005). Aripiprazole in schizophrenia with cocaine dependence: a pilot study. *Journal of clinical psychopharmacology* **25**(4): 363-366.

Berke JD, Hyman SE (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**(3): 515-532.

Berridge CW, Stratford TL, Foote SL, Kelley AE (1997). Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse* **27**(3): 230-241.

Berry MD (2004). Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *Journal of neurochemistry* **90**(2): 257-271.

Berry MD (2007). The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Reviews on recent clinical trials* **2**(1): 3-19.

Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, *et al* (2008). The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nature neuroscience* **11**(7): 780-789.

Bickel WK, Johnson RE, Stitzer ML, Bigelow GE, Liebson IA, Jasinski DR (1987). A clinical trial of buprenorphine: I. Comparison with methadone in the detoxification of heroin addicts. II. Examination of its opioid blocking properties. *NIDA research monograph* **76**: 182-188.

Bisgaard H, Larsen MA, Mazier S, Beuming T, Newman AH, Weinstein H, *et al* (2011). The binding sites for benzotropines and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Neuropharmacology* **60**(1): 182-190.

Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, *et al* (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(16): 8966-8971.

Bossert JM, Ghitza UE, Lu L, Epstein DH, Shaham Y (2005). Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications. *Eur J Pharmacol* **526**(1-3): 36-50.

Botly LC, Burton CL, Rizos Z, Fletcher PJ (2008). Characterization of methylphenidate self-administration and reinstatement in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **199**(1): 55-66.

Boulton AA (1980a). The properties and potential function of some brain trace amines. *Progress in clinical and biological research* **39**: 291-303.

Boulton AA (1980b). Trace amines and mental disorders. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* **7**(3): 261-263.

Bowers MS, Chen BT, Chou JK, Osborne MP, Gass JT, See RE, *et al* (2007). Acamprostate attenuates cocaine- and cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* **195**(3): 397-406.

Bradaia A, Trube G, Stalder H, Norcross RD, Ozmen L, Wettstein JG, *et al* (2009). The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(47): 20081-20086.

Branchek TA, Blackburn TP (2003). Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Current opinion in pharmacology* **3**(1): 90-97.

Breiter HC, Gollub RL, Weisskoff RM, Kennedy DN, Makris N, Berke JD, *et al* (1997). Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron* **19**(3): 591-611.

Briscoe RJ, Vanecek SA, Vallett M, Baird TJ, Holloway FA, Gauvin DV (1998). Reinforcing effects of caffeine, ephedrine, and their binary combination in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **60**(3): 685-693.

Brodie JD, Figueroa E, Dewey SL (2003). Treating cocaine addiction: from preclinical to clinical trial experience with gamma-vinyl GABA. *Synapse* **50**(3): 261-265.

Brodie JD, Figueroa E, Laska EM, Dewey SL (2005). Safety and efficacy of gamma-vinyl GABA (GVG) for the treatment of methamphetamine and/or cocaine addiction. *Synapse* **55**(2): 122-125.

Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, *et al* (2001). Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Molecular pharmacology* **60**(6): 1181-1188.

Burchett SA, Hicks TP (2006). The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Progress in neurobiology* **79**(5-6): 223-246.

Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, *et al* (2002). Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 523-528.

Caine SB, Koob GF (1993). Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science* **260**(5115): 1814-1816.

Cameron DL, Williams JT (1994). Cocaine inhibits GABA release in the VTA through endogenous 5-HT. *J Neurosci* **14**(11 Pt 1): 6763-6767.

Campbell UC, Lac ST, Carroll ME (1999). Effects of baclofen on maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* **143**(2): 209-214.

Canales JJ, Graybiel AM (2000). A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nature neuroscience* **3**(4): 377-383.

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

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* **26**(3): 321-352.

Carlezon WA, Jr., Nestler EJ (2002). Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends in neurosciences* **25**(12): 610-615.

Carlsson ML, Carlsson A, Nilsson M (2004). Schizophrenia: from dopamine to glutamate and back. *Current medicinal chemistry* **11**(3): 267-277.

Carrera MR, Ashley JA, Zhou B, Wirsching P, Koob GF, Janda KD (2000). Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(11): 6202-6206.

Carrigan KA, Dykstra LA (2007). Behavioral effects of morphine and cocaine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Psychopharmacology (Berl)* **191**(4): 985-993.

Carroll KM, Fenton LR, Ball SA, Nich C, Frankforter TL, Shi J, *et al* (2004). Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. *Archives of general psychiatry* **61**(3): 264-272.

Carroll KM, Nich C, Ball SA, McCance E, Rounsavile BJ (1998). Treatment of cocaine and alcohol dependence with psychotherapy and disulfiram. *Addiction* **93**(5): 713-727.

Chen H, Wu J, Zhang J, Hashimoto K (2010). Recent topics on pharmacotherapy for amphetamine-type stimulants abuse and dependence. *Curr Drug Abuse Rev* **3**(4): 222-238.

Chen N, Reith ME (2004a). Interaction between dopamine and its transporter: role of intracellular sodium ions and membrane potential. *J Neurochem* **89**(3): 750-765.

Chen N, Reith ME (2007). Substrates and inhibitors display different sensitivity to expression level of the dopamine transporter in heterologously expressing cells. *J Neurochem* **101**(2): 377-388.

Chen N, Zhen J, Reith ME (2004b). Mutation of Trp84 and Asp313 of the dopamine transporter reveals similar mode of binding interaction for GBR12909 and benztropine as opposed to cocaine. *Journal of neurochemistry* **89**(4): 853-864.

Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *The American journal of psychiatry* **156**(1): 11-18.

Chu PW, Seferian KS, Birdsall E, Truong JG, Riordan JA, Metcalf CS, *et al* (2008). Differential regional effects of methamphetamine on dopamine transport. *Eur J Pharmacol* **590**(1-3): 105-110.

Ciccarone D (2011). Stimulant abuse: pharmacology, cocaine, methamphetamine, treatment, attempts at pharmacotherapy. *Primary care* **38**(1): 41-58, v-vi.

Ciccocioppo R, Sanna PP, Weiss F (2001). Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D(1) antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(4): 1976-1981.

Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol HH (1991). Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* **207**(4): 277-286.

Colpaert FC, Niemegeers CJ, Janssen PA (1979). Discriminative stimulus properties of cocaine: neuropharmacological characteristics as derived from stimulus generalization experiments. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **10**(4): 535-546.

Comer SD, Sullivan MA, Yu E, Rothenberg JL, Kleber HD, Kampman K, *et al* (2006). Injectable, sustained-release naltrexone for the treatment of opioid dependence: a randomized, placebo-controlled trial. *Archives of general psychiatry* **63**(2): 210-218.

Conklin CA, Tiffany ST (2002). Applying extinction research and theory to cue-exposure addiction treatments. *Addiction (Abingdon, England)* **97**(2): 155-167.

Cornish JL, Kalivas PW (2000). Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(15): RC89.

Cornish JL, Kalivas PW (2001). Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. *Journal of addictive diseases* **20**(3): 43-54.

Cornuz J (2006). Treating tobacco use and dependence in clinical practice. *Expert opinion on pharmacotherapy* **7**(6): 783-792.

Cottencin O, Rolland B, Guardia D, Karila L (2012). Current data on methamphetamine. *Rev Prat* **62**(5): 679-681.

Cotter R, Pei Y, Mus L, Harmeier A, Gainetdinov RR, Hoener MC, *et al* (2015). The trace amine-associated receptor 1 modulates methamphetamine's neurochemical and behavioral effects. *Frontiers in neuroscience* **9**: 39.

Cousins MS, Roberts DC, de Wit H (2002). GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug and alcohol dependence* **65**(3): 209-220.

Crespo JA, Sturm K, Saria A, Zernig G (2006). Activation of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens core is necessary for the acquisition of drug reinforcement. *J Neurosci* **26**(22): 6004-6010.

Crombag HS, Grimm JW, Shaham Y (2002). Effect of dopamine receptor antagonists on renewal of cocaine seeking by reexposure to drug-associated contextual cues. *Neuropsychopharmacology* **27**(6): 1006-1015.

Cruickshank CC, Dyer KR (2009). A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction (Abingdon, England)* **104**(7): 1085-1099.

Dackis CA, Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, O'Brien CP (2005). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **30**(1): 205-211.

Dar DE, Mayo C, Uhl GR (2005). The interaction of methylphenidate and bupropion with the dopamine transporter is different than other substrates and ligands. *Biochemical pharmacology* **70**(3): 461-469.

Davids E, Gastpar M (2004). Buprenorphine in the treatment of opioid dependence. *Eur Neuropsychopharmacol* **14**(3): 209-216.

De Beun R, Jansen E, Geerts NE, Slangen JL, Van de Poll NE (1992). Temporal characteristics of appetitive stimulus effects of luteinizing hormone-releasing hormone in male rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **42**(3): 445-450.

de Wit H, Stewart J (1981). Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **75**(2): 134-143.

Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS (1998). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain research* **806**(2): 127-140.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* **305**(5686): 1014-1017.

Desai RI, Kopajtic TA, French D, Newman AH, Katz JL (2005a). Relationship between in vivo occupancy at the dopamine transporter and behavioral effects of cocaine, GBR 12909 [1-{2-[bis-(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl}-4-(3-phenylpropyl)piperazine], and bupropion analogs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **315**(1): 397-404.

Desai RI, Kopajtic TA, Koffarnus M, Newman AH, Katz JL (2005b). Identification of a dopamine transporter ligand that blocks the stimulant effects of cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(8): 1889-1893.

Dewey SL, Chaurasia CS, Chen CE, Volkow ND, Clarkson FA, Porter SP, *et al* (1997). GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. *Synapse* **25**(4): 393-398.

Dewey SL, Morgan AE, Ashby CR, Jr., Horan B, Kushner SA, Logan J, *et al* (1998). A novel strategy for the treatment of cocaine addiction. *Synapse* **30**(2): 119-129.

Dewey SL, Smith GS, Logan J, Brodie JD, Yu DW, Ferrieri RA, *et al* (1992). GABAergic inhibition of endogenous dopamine release measured in vivo with 11C-raclopride and positron emission tomography. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**(10): 3773-3780.

Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, *et al* (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 227-241.

Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5274-5278.

Di Ciano P, Everitt BJ (2001). Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **25**(3): 341-360.

Di Mascio M, Di Giovanni G, Di Matteo V, Prisco S, Esposito E (1998). Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the spontaneous activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain research bulletin* **46**(6): 547-554.

Di Matteo V, De Blasi A, Di Giulio C, Esposito E (2001). Role of 5-HT(2C) receptors in the control of central dopamine function. *Trends in pharmacological sciences* **22**(5): 229-232.

Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E (1999). SB 242084, a selective serotonin_{2C} receptor antagonist, increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropharmacology* **38**(8): 1195-1205.

Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E (2000). Biochemical and electrophysiological evidence that RO 60-0175 inhibits mesolimbic dopaminergic function through serotonin(2C) receptors. *Brain Res* **865**(1): 85-90.

Drouin C, Blanc G, Villegier AS, Glowinski J, Tassin JP (2002a). Critical role of alpha1-adrenergic receptors in acute and sensitized locomotor effects of D-

amphetamine, cocaine, and GBR 12783: influence of preexposure conditions and pharmacological characteristics. *Synapse* **43**(1): 51-61.

Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, *et al* (2002b). Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(7): 2873-2884.

Dutta AK, Zhang S, Kolhatkar R, Reith ME (2003). Dopamine transporter as target for drug development of cocaine dependence medications. *Eur J Pharmacol* **479**(1-3): 93-106.

Eberle-Wang K, Mikeladze Z, Uryu K, Chesselet MF (1997). Pattern of expression of the serotonin2C receptor messenger RNA in the basal ganglia of adult rats. *The Journal of comparative neurology* **384**(2): 233-247.

Epstein DH, Preston KL (2003). The reinstatement model and relapse prevention: a clinical perspective. *Psychopharmacology (Berl)* **168**(1-2): 31-41.

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

Erb S, Hitchcott PK, Rajabi H, Mueller D, Shaham Y, Stewart J (2000). Alpha-2 adrenergic receptor agonists block stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **23**(2): 138-150.

Erb S, Shaham Y, Stewart J (1996). Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. *Psychopharmacology (Berl)* **128**(4): 408-412.

Espinoza S, Ghisi V, Emanuele M, Leo D, Sukhanov I, Sotnikova TD, *et al* (2015). Postsynaptic D2 dopamine receptor supersensitivity in the striatum of mice lacking TAAR1. *Neuropharmacology* **93**: 308-313.

Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2008). Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **363**(1507): 3125-3135.

Everitt BJ, Robbins TW (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience* **8**(11): 1481-1489.

Everitt BJ, Wolf ME (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(9): 3312-3320.

Fagerstrom K, Balfour DJ (2006). Neuropharmacology and potential efficacy of new treatments for tobacco dependence. *Expert opinion on investigational drugs* **15**(2): 107-116.

Fechtner RD, Khouri AS, Figueroa E, Ramirez M, Federico M, Dewey SL, *et al* (2006). Short-term treatment of cocaine and/or methamphetamine abuse with vigabatrin: ocular safety pilot results. *Arch Ophthalmol* **124**(9): 1257-1262.

Feil J, Sheppard D, Fitzgerald PB, Yucel M, Lubman DI, Bradshaw JL (2010). Addiction, compulsive drug seeking, and the role of frontostriatal mechanisms in regulating inhibitory control. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **35**(2): 248-275.

Feltenstein MW, Altar CA, See RE (2007). Aripiprazole blocks reinstatement of cocaine seeking in an animal model of relapse. *Biological psychiatry* **61**(5): 582-590.

Feltenstein MW, See RE (2006). Potentiation of cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats by the anxiogenic drug yohimbine. *Behavioural brain research* **174**(1): 1-8.

Feltenstein MW, See RE (2008). The neurocircuitry of addiction: an overview. *British journal of pharmacology* **154**(2): 261-274.

Ferragud A, Velazquez-Sanchez C, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, Merino V, Carda M, *et al* (2009). A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology* **207**(2): 281-289.

Filip M, Frankowska M, Przegalinski E (2007). Effects of GABA(B) receptor antagonist, agonists and allosteric positive modulator on the cocaine-induced self-administration and drug discrimination. *Eur J Pharmacol* **574**(2-3): 148-157.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Hanson GR (2009). Psychostimulant-induced alterations in vesicular monoamine transporter-2 function: neurotoxic and therapeutic implications. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 133-138.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 681-698.

Foltin RW, Haney M (2000). Conditioned effects of environmental stimuli paired with smoked cocaine in humans. *Psychopharmacology (Berl)* **149**(1): 24-33.

French SJ, Hailstone JC, Totterdell S (2003a). Basolateral amygdala efferents to the ventral subiculum preferentially innervate pyramidal cell dendritic spines. *Brain Res* **981**(1-2): 160-167.

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

Fuchs RA, Branham RK, See RE (2006). Different neural substrates mediate cocaine seeking after abstinence versus extinction training: a critical role for the dorsolateral caudate-putamen. *J Neurosci* **26**(13): 3584-3588.

Fuchs RA, Evans KA, Ledford CC, Parker MP, Case JM, Mehta RH, *et al* (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* **30**(2): 296-309.

Fung YK, Uretsky NJ (1982). The importance of calcium in the amphetamine-induced stimulation of dopamine synthesis in mouse striata in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **223**(2): 477-482.

Gainetdinov RR, Caron MG (2003). Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annual review of pharmacology and toxicology* **43**: 261-284.

Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG (1999). Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* **283**(5400): 397-401.

Galley G, Stalder H, Goergler A, Hoener MC, Norcross RD (2012). Optimisation of imidazole compounds as selective TAAR1 agonists: discovery of R05073012. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **22**(16): 5244-5248.

Garcia-Fuster MJ, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2009). Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain in the rat brain: individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**(5): 1123-1134.

Garcia-Fuster MJ, Flagel SB, Mahmood ST, Mayo LM, Thompson RC, Watson SJ, *et al* (2011). Decreased proliferation of adult hippocampal stem cells during cocaine withdrawal: possible role of the cell fate regulator FADD. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **36**(11): 2303-2317.

Garcia-Fuster MJ, Miralles A, Garcia-Sevilla JA (2007). Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **32**(2): 399-411.

George TP, Chawarski MC, Pakes J, Carroll KM, Kosten TR, Schottenfeld RS (2000). Disulfiram versus placebo for cocaine dependence in buprenorphine-maintained subjects: a preliminary trial. *Biological psychiatry* **47**(12): 1080-1086.

Gerber GJ, Stretch R (1975). Drug-induced reinstatement of extinguished self-administration behavior in monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* **3**(6): 1055-1061.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**(6566): 606-612.

Glatz AC, Ehrlich M, Bae RS, Clarke MJ, Quinlan PA, Brown EC, *et al* (2002). Inhibition of cocaine self-administration by fluoxetine or D-fenfluramine combined with phentermine. *Pharmacol Biochem Behav* **71**(1-2): 197-204.

Gonzalez G, Desai R, Sofuoglu M, Poling J, Oliveto A, Gonsai K, *et al* (2007). Clinical efficacy of gabapentin versus tiagabine for reducing cocaine use among cocaine dependent methadone-treated patients. *Drug and alcohol dependence* **87**(1): 1-9.

Gonzalez G, Sevarino K, Sofuoglu M, Poling J, Oliveto A, Gonsai K, *et al* (2003). Tiagabine increases cocaine-free urines in cocaine-dependent methadone-treated patients: results of a randomized pilot study. *Addiction* **98**(11): 1625-1632.

Gonzalez-Cuevas G, Aujla H, Martin-Fardon R, Lopez-Moreno JA, Navarro M, Weiss F (2007). Subchronic cannabinoid agonist (WIN 55,212-2) treatment during

cocaine abstinence alters subsequent cocaine seeking behavior. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **32**(11): 2260-2266.

Goodwin JS, Larson GA, Swant J, Sen N, Javitch JA, Zahniser NR, *et al* (2009). Amphetamine and methamphetamine differentially affect dopamine transporters in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **284**(5): 2978-2989.

Gorelick DA, Gardner EL, Xi ZX (2004). Agents in development for the management of cocaine abuse. *Drugs* **64**(14): 1547-1573.

Goto Y, Grace AA (2005). Dopamine-dependent interactions between limbic and prefrontal cortical plasticity in the nucleus accumbens: disruption by cocaine sensitization. *Neuron* **47**(2): 255-266.

Grabowski J, Rhoades H, Schmitz J, Stotts A, Daruzska LA, Creson D, *et al* (2001). Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: a double-blind randomized clinical trial. *Journal of clinical psychopharmacology* **21**(5): 522-526.

Grabowski J, Rhoades H, Stotts A, Cowan K, Kopecky C, Dougherty A, *et al* (2004). Agonist-like or antagonist-like treatment for cocaine dependence with methadone for heroin dependence: two double-blind randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **29**(5): 969-981.

Grabowski J, Roache JD, Schmitz JM, Rhoades H, Creson D, Korszun A (1997). Replacement medication for cocaine dependence: methylphenidate. *Journal of clinical psychopharmacology* **17**(6): 485-488.

Grandy DK (2007). Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? *Pharmacology & therapeutics* **116**(3): 355-390.

Gray MA, Critchley HD (2007). Interoceptive basis to craving. *Neuron* **54**(2): 183-186.

Grueter BA, Rothwell PE, Malenka RC (2012). Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. *Current opinion in neurobiology* **22**(3): 545-551.

Hando J, Topp L, Hall W (1997). Amphetamine-related harms and treatment preferences of regular amphetamine users in Sydney, Australia. *Drug and alcohol dependence* **46**(1-2): 105-113.

Haney M, Hart CL, Foltin RW (2006). Effects of baclofen on cocaine self-administration: opioid- and nonopioid-dependent volunteers. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **31**(8): 1814-1821.

Harris DS, Boxenbaum H, Everhart ET, Sequeira G, Mendelson JE, Jones RT (2003a). The bioavailability of intranasal and smoked methamphetamine. *Clinical pharmacology and therapeutics* **74**(5): 475-486.

Harris GC, Aston-Jones G (2003b). Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **28**(1): 73-76.

Harris RA, Snell D, Loh HH (1978). Effects of d-amphetamine, monomethoxyamphetamines and hallucinogens on schedule-controlled behavior. *J Pharmacol Exp Ther* **204**(1): 103-117.

Hart CL, Haney M, Vosburg SK, Rubin E, Foltin RW (2008). Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **33**(4): 761-768.

Hatsukami DK, Fischman MW (1996). Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *JAMA* **276**(19): 1580-1588.

Hawks D, Mitcheson M, Ogborne A, Edwards G (1969). Abuse of methylamphetamine. *British medical journal* **2**(5659): 715-721.

Hearing MC, Miller SW, See RE, McGinty JF (2008). Relapse to cocaine seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the prefrontal cortex of abstinent rats. *Psychopharmacology* **198**(1): 77-91.

Heidbreder CA, Hagan JJ (2005). Novel pharmacotherapeutic approaches for the treatment of drug addiction and craving. *Current opinion in pharmacology* **5**(1): 107-118.

Herve D, Pickel VM, Joh TH, Beaudet A (1987). Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res* **435**(1-2): 71-83.

Hiranita T, Soto PL, Newman AH, Katz JL (2009). Assessment of reinforcing effects of benztropine analogs and their effects on cocaine self-administration in rats:

comparisons with monoamine uptake inhibitors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **329**(2): 677-686.

Hodos W (1961). Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* **134**(3483): 943-944.

Holter SM, Landgraf R, Zieglgansberger W, Spanagel R (1997). Time course of acamprosate action on operant ethanol self-administration after ethanol deprivation. *Alcoholism, clinical and experimental research* **21**(5): 862-868.

Howell LL, Byrd LD (1995). Serotonergic modulation of the behavioral effects of cocaine in the squirrel monkey. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **275**(3): 1551-1559.

Hu G, Duffy P, Swanson C, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW (1999). The regulation of dopamine transmission by metabotropic glutamate receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **289**(1): 412-416.

Huang X, Zhan CG (2007). How dopamine transporter interacts with dopamine: insights from molecular modeling and simulation. *Biophys J* **93**(10): 3627-3639.

Hyman SE (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *The American journal of psychiatry* **162**(8): 1414-1422.

Hyman SE, Malenka RC (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature reviews Neuroscience* **2**(10): 695-703.

Indarte M, Madura JD, Surratt CK (2008). Dopamine transporter comparative molecular modeling and binding site prediction using the LeuT(Aa) leucine transporter as a template. *Proteins* **70**(3): 1033-1046.

Ito R, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ (2002). Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci* **22**(14): 6247-6253.

Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nature neuroscience* **7**(4): 389-397.

Jaffe JH (1990). Trivializing dependence. *British journal of addiction* **85**(11): 1425-1427; discussion 1429-1431.

Jaffe JH, Cascella NG, Kumor KM, Sherer MA (1989). Cocaine-induced cocaine craving. *Psychopharmacology (Berl)* **97**(1): 59-64.

Janssen PA, Leysen JE, Megens AA, Awouters FH (1999). Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **2**(3): 229-240.

Jarrard LE (1995). What does the hippocampus really do? *Behavioural brain research* **71**(1-2): 1-10.

Jay TM (2003). Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in neurobiology* **69**(6): 375-390.

Jing L, Zhang Y, Li JX (2015). Effects of the trace amine associated receptor 1 agonist RO5263397 on abuse-related behavioral indices of methamphetamine in rats. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **18**(4).

Johnson BA (2005). Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. *CNS Drugs* **19**(10): 873-896.

Johnson SW, North RA (1992). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *The Journal of physiology* **450**: 455-468.

Jufer RA, Wstadik A, Walsh SL, Levine BS, Cone EJ (2000). Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. *Journal of analytical toxicology* **24**(7): 467-477.

Kahn R, Biswas K, Childress AR, Shoptaw S, Fudala PJ, Gorgon L, *et al* (2009). Multi-center trial of baclofen for abstinence initiation in severe cocaine-dependent individuals. *Drug and alcohol dependence* **103**(1-2): 59-64.

Kalivas PW (2008). Addiction as a pathology in prefrontal cortical regulation of corticostriatal habit circuitry. *Neurotoxicity research* **14**(2-3): 185-189.

Kalivas PW (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature reviews Neuroscience* **10**(8): 561-572.

Kalivas PW, Duffy P (1993). Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J Neurosci* **13**(1): 266-275.

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

Kalivas PW, McFarland K, Bowers S, Szumlinski K, Xi ZX, Baker D (2003b). Glutamate transmission and addiction to cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1003**: 169-175.

Kalivas PW, O'Brien C (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* **33**(1): 166-180.

Kalivas PW, Volkow ND (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry* **162**(8): 1403-1413.

Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, *et al* (2004). A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug and alcohol dependence* **75**(3): 233-240.

Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Sparkman T, O'Brien CP (2003). A pilot trial of olanzapine for the treatment of cocaine dependence. *Drug and alcohol dependence* **70**(3): 265-273.

Kankaanpaa A, Lillsunde P, Ruotsalainen M, Ahtee L, Seppala T (1996). 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 dose-dependently attenuates cocaine- and amphetamine-induced elevations of extracellular dopamine in the nucleus accumbens and the dorsal striatum. *Pharmacology & toxicology* **78**(5): 317-321.

Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, *et al* (2008). New treatments for cocaine dependence: a focused review. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **11**(3): 425-438.

Katz JL, Agoston GE, Alling KL, Kline RH, Forster MJ, Woolverton WL, *et al* (2001). Dopamine transporter binding without cocaine-like behavioral effects: synthesis and evaluation of bztropine analogs alone and in combination with cocaine in rodents. *Psychopharmacology* **154**(4): 362-374.

Katz JL, Higgins ST (2003a). The validity of the reinstatement model of craving and relapse to drug use. *Psychopharmacology (Berl)* **168**(1-2): 21-30.

Katz JL, Izenwasser S, Kline RH, Allen AC, Newman AH (1999). Novel 3alpha-diphenylmethoxytropane analogs: selective dopamine uptake inhibitors with behavioral effects distinct from those of cocaine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **288**(1): 302-315.

Katz JL, Kopajtic TA, Agoston GE, Newman AH (2004). Effects of N-substituted analogs of benztropine: diminished cocaine-like effects in dopamine transporter ligands. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **309**(2): 650-660.

Katz JL, Libby TA, Kopajtic T, Husbands SM, Newman AH (2003b). Behavioral effects of rimcazole analogues alone and in combination with cocaine. *Eur J Pharmacol* **468**(2): 109-119.

Katz JL, Newman AH, Izenwasser S (1997). Relations between heterogeneity of dopamine transporter binding and function and the behavioral pharmacology of cocaine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **57**(3): 505-512.

Kenakin TP, Morgan PH (1989). Theoretical effects of single and multiple transducer receptor coupling proteins on estimates of the relative potency of agonists. *Molecular pharmacology* **35**(2): 214-222.

Kilts CD, Schweitzer JB, Quinn CK, Gross RE, Faber TL, Muhammad F, *et al* (2001). Neural activity related to drug craving in cocaine addiction. *Archives of general psychiatry* **58**(4): 334-341.

Kish SJ (2008). Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **178**(13): 1679-1682.

Kita H, Kitai ST (1988). Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain research* **447**(2): 346-352.

Kleven MS, Woolverton WL (1990). Effects of bromocriptine and desipramine on behavior maintained by cocaine or food presentation in rhesus monkeys. *Psychopharmacology* **101**(2): 208-213.

Knackstedt LA, Kalivas PW (2009). Glutamate and reinstatement. *Current opinion in pharmacology* **9**(1): 59-64.

Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA, Kornetsky C (2001). Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **68**(4): 797-803.

Kohl S, Heekeren K, Klosterkotter J, Kuhn J (2013). Prepulse inhibition in psychiatric disorders--apart from schizophrenia. *Journal of psychiatric research* **47**(4): 445-452.

Koob GF (1992). Neural mechanisms of drug reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences* **654**: 171-191.

Koob GF (2010). The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* **1314**: 3-14.

Koob GF, Le HT, Creese I (1987). The D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. *Neuroscience letters* **79**(3): 315-320.

Koob GF, Le Moal M (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**(5335): 52-58.

Koob GF, Le Moal M (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **24**(2): 97-129.

Koob GF, Volkow ND (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **35**(1): 217-238.

Kopajtic TA, Liu Y, Surratt CK, Donovan DM, Newman AH, Katz JL (2010). Dopamine transporter-dependent and -independent striatal binding of the benzotropine analog JHW 007, a cocaine antagonist with low abuse liability. *J Pharmacol Exp Ther* **335**(3): 703-714.

Kopell BH, Greenberg BD (2008). Anatomy and physiology of the basal ganglia: implications for DBS in psychiatry. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **32**(3): 408-422.

Kosten T, Oliveto A, Feingold A, Poling J, Sevarino K, McCance-Katz E, et al (2003). Desipramine and contingency management for cocaine and opiate dependence in buprenorphine maintained patients. *Drug and alcohol dependence* **70**(3): 315-325.

Kranzler HR, Bursleson JA, Korner P, Del Boca FK, Bohn MJ, Brown J, *et al* (1995). Placebo-controlled trial of fluoxetine as an adjunct to relapse prevention in alcoholics. *The American journal of psychiatry* **152**(3): 391-397.

Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends in neurosciences* **14**(7): 299-302.

Kulkarni SS, Grundt P, Kopajtic T, Katz JL, Newman AH (2004). Structure-activity relationships at monoamine transporters for a series of N-substituted 3alpha-(bis[4-fluorophenyl]methoxy)tropanes: comparative molecular field analysis, synthesis, and pharmacological evaluation. *Journal of medicinal chemistry* **47**(13): 3388-3398.

Kushner SA, Dewey SL, Kornetsky C (1999). The irreversible gamma-aminobutyric acid (GABA) transaminase inhibitor gamma-vinyl-GABA blocks cocaine self-administration in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **290**(2): 797-802.

Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D (2002). Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci* **22**(20): 8951-8960.

Lasseter HC, Xie X, Ramirez DR, Fuchs RA (2010). Prefrontal cortical regulation of drug seeking in animal models of drug relapse. *Current topics in behavioral neurosciences* **3**: 101-117.

Lategan AJ, Marien MR, Colpaert FC (1990). Effects of locus coeruleus lesions on the release of endogenous dopamine in the rat nucleus accumbens and caudate nucleus as determined by intracerebral microdialysis. *Brain research* **523**(1): 134-138.

Latt NC, Jurd S, Houseman J, Wutzke SE (2002). Naltrexone in alcohol dependence: a randomised controlled trial of effectiveness in a standard clinical setting. *The Medical journal of Australia* **176**(11): 530-534.

Layer RT, Uretsky NJ, Wallace LJ (1992). Effect of serotonergic agonists in the nucleus accumbens on d-amphetamine-stimulated locomotion. *Life sciences* **50**(11): 813-820.

Le AD, Poulos CX, Harding S, Watchus J, Juzysch W, Shaham Y (1999). Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology* **21**(3): 435-444.

Lee B, Platt DM, Rowlett JK, Adewale AS, Spealman RD (2005). Attenuation of behavioral effects of cocaine by the Metabotropic Glutamate Receptor 5 Antagonist 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine in squirrel monkeys: comparison with dizocilpine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **312**(3): 1232-1240.

Lee B, Tiefenbacher S, Platt DM, Spealman RD (2004). Pharmacological blockade of alpha2-adrenoceptors induces reinstatement of cocaine-seeking behavior in squirrel monkeys. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **29**(4): 686-693.

Leo D, Mus L, Espinoza S, Hoener MC, Sotnikova TD, Gainetdinov RR (2014). Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: role of D2 dopamine autoreceptors. *Neuropharmacology* **81**: 283-291.

Leri F, Tremblay A, Sorge RE, Stewart J (2004). Methadone maintenance reduces heroin- and cocaine-induced relapse without affecting stress-induced relapse in a rodent model of poly-drug use. *Neuropsychopharmacology* **29**(7): 1312-1320.

Levin FR, Evans SM, Brooks DJ, Garawi F (2007). Treatment of cocaine dependent treatment seekers with adult ADHD: double-blind comparison of methylphenidate and placebo. *Drug and alcohol dependence* **87**(1): 20-29.

Lew M (2007). Good statistical practice in pharmacology. Problem 2. *British journal of pharmacology* **152**(3): 299-303.

Li CY, Zhou WZ, Zhang PW, Johnson C, Wei L, Uhl GR (2011). Meta-analysis and genome-wide interpretation of genetic susceptibility to drug addiction. *BMC genomics* **12**: 508.

Li L, Hiranita T, Hayashi S, Newman AH, Katz JL (2013). The stereotypy-inducing effects of N-substituted benzotropine analogs alone and in combination with cocaine do not account for their blockade of cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* **225**(3): 733-742.

Li SM, Newman AH, Katz JL (2005). Place conditioning and locomotor effects of N-substituted, 4',4''-difluorobenzotropine analogs in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **313**(3): 1223-1230.

Liberles SD, Buck LB (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* **442**(7103): 645-650.

Lile JA, Morgan D, Birmingham AM, Davies HM, Nader MA (2004). Effects of the dopamine reuptake inhibitor PTT on reinstatement and on food- and cocaine-maintained responding in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **174**(2): 246-253.

Lindemann L, Ebeling M, Kratochwil NA, Bunzow JR, Grandy DK, Hoener MC (2005a). Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics* **85**(3): 372-385.

Lindemann L, Hoener MC (2005b). A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends in pharmacological sciences* **26**(5): 274-281.

Lindemann L, Meyer CA, Jeanneau K, Bradaia A, Ozmen L, Bluethmann H, *et al* (2008). Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **324**(3): 948-956.

Lindsey KP, Wilcox KM, Votaw JR, Goodman MM, Plisson C, Carroll FI, *et al* (2004). Effects of dopamine transporter inhibitors on cocaine self-administration in rhesus monkeys: relationship to transporter occupancy determined by positron emission tomography neuroimaging. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(3): 959-969.

Liprando LA, Miner LH, Blakely RD, Lewis DA, Sesack SR (2004). Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. *Synapse* **52**(4): 233-244.

Lodge DJ, Grace AA (2008). Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: a mechanism of behavioral sensitization. *J Neurosci* **28**(31): 7876-7882.

Loland CJ, Desai RI, Zou MF, Cao J, Grundt P, Gerstbrein K, *et al* (2008). Relationship between conformational changes in the dopamine transporter and cocaine-like subjective effects of uptake inhibitors. *Molecular pharmacology* **73**(3): 813-823.

Loland CJ, Norregaard L, Litman T, Gether U (2002). Generation of an activating Zn(2+) switch in the dopamine transporter: mutation of an intracellular tyrosine constitutively alters the conformational equilibrium of the transport cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(3): 1683-1688.

Lu H, Cheng PL, Lim BK, Khoshnevisrad N, Poo MM (2010). Elevated BDNF after cocaine withdrawal facilitates LTP in medial prefrontal cortex by suppressing GABA inhibition. *Neuron* **67**(5): 821-833.

Lu L, Liu D, Ceng X, Ma L (2000). Differential roles of corticotropin-releasing factor receptor subtypes 1 and 2 in opiate withdrawal and in relapse to opiate dependence. *Eur J Neurosci* **12**(12): 4398-4404.

Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, Lupica CR, Aston-Jones G (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* **333**(6040): 353-357.

Mahler SV, Smith RJ, Aston-Jones G (2013). Interactions between VTA orexin and glutamate in cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **226**(4): 687-698.

Mahoney JJ, 3rd, Kalechstein AD, De La Garza R, 2nd, Newton TF (2007). A qualitative and quantitative review of cocaine-induced craving: the phenomenon of priming. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **31**(3): 593-599.

Mailman RB, Murthy V (2010). Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? *Current pharmaceutical design* **16**(5): 488-501.

Malcolm R, Olive MF, Lechner W (2008). The safety of disulfiram for the treatment of alcohol and cocaine dependence in randomized clinical trials: guidance for clinical practice. *Expert opinion on drug safety* **7**(4): 459-472.

Malcolm R, Swayngim K, Donovan JL, DeVane CL, Elkashef A, Chiang N, *et al* (2006). Modafinil and cocaine interactions. *The American journal of drug and alcohol abuse* **32**(4): 577-587.

Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF (1993). Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl)* **112**(2-3): 163-182.

Martell BA, Mitchell E, Poling J, Gonsai K, Kosten TR (2005). Vaccine pharmacotherapy for the treatment of cocaine dependence. *Biological psychiatry* **58**(2): 158-164.

Mattick RP, Breen C, Kimber J, Davoli M (2009). Methadone maintenance therapy versus no opioid replacement therapy for opioid dependence. *The Cochrane database of systematic reviews*(3): CD002209.

Maxwell JC, Rutkowski BA (2008). The prevalence of methamphetamine and amphetamine abuse in North America: a review of the indicators, 1992-2007. *Drug Alcohol Rev* **27**(3): 229-235.

McClure SM, Daw ND, Montague PR (2003). A computational substrate for incentive salience. *Trends in neurosciences* **26**(8): 423-428.

McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW (2004). Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci* **24**(7): 1551-1560.

McFarland K, Kalivas PW (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* **21**(21): 8655-8663.

McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW (2003). Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(8): 3531-3537.

McGaugh JL (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in neurosciences* **25**(9): 456.

McGinty JF, Whitfield TW, Jr., Berglind WJ (2010). Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain research* **1314**: 183-193.

McGregor C, Srisurapanont M, Jittiwutikarn J, Laobhripatr S, Wongtan T, White JM (2005). The nature, time course and severity of methamphetamine withdrawal. *Addiction* **100**(9): 1320-1329.

McKay JR, Franklin TR, Patapis N, Lynch KG (2006). Conceptual, methodological, and analytical issues in the study of relapse. *Clinical psychology review* **26**(2): 109-127.

McLaughlin J, See RE (2003). Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* **168**(1-2): 57-65.

Melis M, Spiga S, Diana M (2005). The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *International review of neurobiology* **63**: 101-154.

Mello NK, Lukas SE, Bree MP, Mendelson JH (1990). Desipramine effects on cocaine self-administration by rhesus monkeys. *Drug and alcohol dependence* **26**(2): 103-116.

Mello NK, Negus SS (1996). Preclinical evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self-administration procedures. *Neuropsychopharmacology* **14**(6): 375-424.

Mello NK, Negus SS (2007). Effects of d-amphetamine and buprenorphine combinations on speedball (cocaine+heroin) self-administration by rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **32**(9): 1985-1994.

Mercuri NB, Bernardi G (2005). The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends in pharmacological sciences* **26**(7): 341-344.

Mihindou C, Vouillac C, Koob GF, Ahmed SH (2011). Preclinical validation of a novel cocaine exposure therapy for relapse prevention. *Biological psychiatry* **70**(6): 593-598.

Miller GM (2011). The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *Journal of neurochemistry* **116**(2): 164-176.

Miller GM, Verrico CD, Jassen A, Konar M, Yang H, Panas H, *et al* (2005). Primate trace amine receptor 1 modulation by the dopamine transporter. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **313**(3): 983-994.

Minozzi S, Amato L, Davoli M, Farrell M, Lima Reisser AA, Pani PP, *et al* (2008). Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD006754.

Moghaddam B, Adams BW (1998). Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* **281**(5381): 1349-1352.

Montoya ID, Gorelick DA, Preston KL, Schroeder JR, Umbricht A, Cheskin LJ, *et al* (2004). Randomized trial of buprenorphine for treatment of concurrent opiate and cocaine dependence. *Clinical pharmacology and therapeutics* **75**(1): 34-48.

Mooney ME, Herin DV, Schmitz JM, Moukaddam N, Green CE, Grabowski J (2009). Effects of oral methamphetamine on cocaine use: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Drug and alcohol dependence* **101**(1-2): 34-41.

Mooney ME, Schmitz JM, Moeller FG, Grabowski J (2007). Safety, tolerability and efficacy of levodopa-carbidopa treatment for cocaine dependence: two double-blind, randomized, clinical trials. *Drug and alcohol dependence* **88**(2-3): 214-223.

Moore RY, Bloom FE (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annual review of neuroscience* **2**: 113-168.

Morgan AE, Dewey SL (1998). Effects of pharmacologic increases in brain GABA levels on cocaine-induced changes in extracellular dopamine. *Synapse* **28**(1): 60-65.

Mueller D, Stewart J (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural brain research* **115**(1): 39-47.

Navarro HA, Gilmour BP, Lewin AH (2006). A rapid functional assay for the human trace amine-associated receptor 1 based on the mobilization of internal calcium. *Journal of biomolecular screening* **11**(6): 688-693.

Navarro HA, Howard JL, Pollard GT, Carroll FI (2005). Abstract 67th Annual Meeting of the College on Problems of Drug Dependence.

Negus SS, Mello NK, Kimmel HL, Howell LL, Carroll FI (2009). Effects of the monoamine uptake inhibitors RTI-112 and RTI-113 on cocaine- and food-maintained responding in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* **91**(3): 333-338.

Negus SS, Mello NK, Lamas X, Mendelson JH (1996). Acute and chronic effects of flupenthixol on the discriminative stimulus and reinforcing effects of cocaine in rhesus monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **278**(2): 879-890.

Nestler EJ (2002a). Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiology of learning and memory* **78**(3): 637-647.

Nestler EJ (2002b). From neurobiology to treatment: progress against addiction. *Nature neuroscience* **5 Suppl**: 1076-1079.

Nestler EJ (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in pharmacological sciences* **25**(4): 210-218.

Newman AH, Agoston GE (1998). Novel benzotropine [3a-(diphenylmethoxy)tropane] analogs as probes for the dopamine transporter. *Curr Med Chem* **5**(4): 305-319.

Newman AH, Katz J (2009). Atypical Dopamine Uptake Inhibitors that Provide Clues About Cocaine's Mechanism at the Dopamine Transporter. In: Napier S, Bingham M (eds). *Topics in Medicinal Chemistry*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. Vol 4, pp 95-129.

Norman AB, Norman MK, Buesing WR, Tabet MR, Tsibulsky VL, Ball WJ (2009). The effect of a chimeric human/murine anti-cocaine monoclonal antibody on cocaine self-administration in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **328**(3): 873-881.

O'Brien CP (1997). A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science* **278**(5335): 66-70.

O'Brien CP (2008). Review. Evidence-based treatments of addiction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **363**(1507): 3277-3286.

O'Brien CP, Gardner EL (2005). Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models. *Pharmacol Ther* **108**(1): 18-58.

Orson FM, Kinsey BM, Singh RA, Wu Y, Gardner T, Kosten TR (2008). Substance abuse vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1141**: 257-269.

Panas HN, Lynch LJ, Vallender EJ, Xie Z, Chen GL, Lynn SK, *et al* (2010). Normal thermoregulatory responses to 3-iodothyronamine, trace amines and amphetamine-like psychostimulants in trace amine associated receptor 1 knockout mice. *Journal of neuroscience research* **88**(9): 1962-1969.

Parsons LH, Weiss F, Koob GF (1998). Serotonin1B receptor stimulation enhances cocaine reinforcement. *J Neurosci* **18**(23): 10078-10089.

Pei Y, Lee J, Leo D, Gainetdinov RR, Hoener MC, Canales JJ (2014). Activation of the trace amine-associated receptor 1 prevents relapse to cocaine seeking.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **39**(10): 2299-2308.

Penetar DM, Looby AR, Su Z, Lundahl LH, Eros-Sarnyai M, McNeil JF, *et al* (2006). Benztropine pretreatment does not affect responses to acute cocaine administration in human volunteers. *Human psychopharmacology* **21**(8): 549-559.

Peng XQ, Ashby CR, Jr., Spiller K, Li X, Li J, Thomasson N, *et al* (2009). The preferential dopamine D3 receptor antagonist S33138 inhibits cocaine reward and cocaine-triggered relapse to drug-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology* **56**(4): 752-760.

Peters FT, Samyn N, Wahl M, Kraemer T, De Boeck G, Maurer HH (2003). Concentrations and ratios of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, and MDEA enantiomers determined in plasma samples from clinical toxicology and driving under the influence of drugs cases by GC-NICI-MS. *Journal of analytical toxicology* **27**(8): 552-559.

Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ (2009). Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & memory* **16**(5): 279-288.

Petrakis IL, Carroll KM, Nich C, Gordon LT, McCance-Katz EF, Frankforter T, *et al* (2000). Disulfiram treatment for cocaine dependence in methadone-maintained opioid addicts. *Addiction* **95**(2): 219-228.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain research Brain research reviews* **38**(1-2): 247-289.

Phelix CF, Broderick PA (1995). Light microscopic immunocytochemical evidence of converging serotonin and dopamine terminals in ventrolateral nucleus accumbens. *Brain research bulletin* **37**(1): 37-40.

Piazza PV, Le Moal M (1998). The role of stress in drug self-administration. *Trends in pharmacological sciences* **19**(2): 67-74.

Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW (1996). Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**(4): 1550-1560.

Platt DM, Rowlett JK, Spealman RD (2007). Noradrenergic mechanisms in cocaine-induced reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **322**(2): 894-902.

Poling J, Oliveto A, Petry N, Sofuoglu M, Gonsai K, Gonzalez G, *et al* (2006). Six-month trial of bupropion with contingency management for cocaine dependence in a methadone-maintained population. *Archives of general psychiatry* **63**(2): 219-228.

Premont RT, Gainetdinov RR, Caron MG (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(17): 9474-9475.

Preti A (2000). Vanoxerine National Institute on Drug Abuse. *Curr Opin Investig Drugs* **1**(2): 241-251.

Prisco S, Pagannone S, Esposito E (1994). Serotonin-dopamine interaction in the rat ventral tegmental area: an electrophysiological study in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **271**(1): 83-90.

Raje S, Cao J, Newman AH, Gao H, Eddington ND (2003). Evaluation of the blood-brain barrier transport, population pharmacokinetics, and brain distribution of benztropine analogs and cocaine using in vitro and in vivo techniques. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **307**(2): 801-808.

Raje S, Cornish J, Newman AH, Cao J, Katz JL, Eddington ND (2005). Pharmacodynamic assessment of the benztropine analogues AHN-1055 and AHN-2005 using intracerebral microdialysis to evaluate brain dopamine levels and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. *Pharmaceutical research* **22**(4): 603-612.

Raje S, Dowling TC, Eddington ND (2002). Determination of the benztropine analog AHN-1055, a dopamine uptake inhibitor, in rat plasma and brain by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **768**(2): 305-313.

Ranaldi R, Anderson KG, Carroll FI, Woolverton WL (2000). Reinforcing and discriminative stimulus effects of RTI 111, a 3-phenyltropane analog, in rhesus monkeys: interaction with methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* **153**(1): 103-110.

Reese EA, Bunzow JR, Arttamangkul S, Sonders MS, Grandy DK (2007). Trace amine-associated receptor 1 displays species-dependent stereoselectivity for

isomers of methamphetamine, amphetamine, and para-hydroxyamphetamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **321**(1): 178-186.

Reid MS, Casadonte P, Baker S, Sanfilipo M, Braunstein D, Hitzemann R, *et al* (2005). A placebo-controlled screening trial of olanzapine, valproate, and coenzyme Q10/L-carnitine for the treatment of cocaine dependence. *Addiction* **100 Suppl 1**: 43-57.

Revel FG, Meyer CA, Bradaia A, Jeanneau K, Calcagno E, Andre CB, *et al* (2012a). Brain-specific overexpression of trace amine-associated receptor 1 alters monoaminergic neurotransmission and decreases sensitivity to amphetamine. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **37**(12): 2580-2592.

Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Bradaia A, Sotnikova TD, Mory R, *et al* (2011). TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(20): 8485-8490.

Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Ferragud A, Velazquez-Sanchez C, Sotnikova TD, *et al* (2012b). Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics. *Biological psychiatry* **72**(11): 934-942.

Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, Mory R, Bradaia A, Buchy D, *et al* (2013). A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. *Molecular psychiatry* **18**(5): 543-556.

Richardson NR, Roberts DC (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* **66**(1): 1-11.

Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ (1990). Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life sciences* **46**(9): 635-645.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**(4819): 1219-1223.

Roache JD, Grabowski J, Schmitz JM, Creson DL, Rhoades HM (2000). Laboratory measures of methylphenidate effects in cocaine-dependent patients receiving treatment. *Journal of clinical psychopharmacology* **20**(1): 61-68.

Roberts DC (1993). Self-administration of GBR 12909 on a fixed ratio and progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology* **111**(2): 202-206.

Roberts DC, Brebner K (2000). GABA modulation of cocaine self-administration. *Annals of the New York Academy of Sciences* **909**: 145-158.

Robinson JB (1985). Stereoselectivity and isoenzyme selectivity of monoamine oxidase inhibitors. Enantiomers of amphetamine, N-methylamphetamine and deprenyl. *Biochemical pharmacology* **34**(23): 4105-4108.

Robinson TE, Becker JB (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain research* **396**(2): 157-198.

Robinson TE, Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3): 247-291.

Robinson TE, Berridge KC (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction (Abingdon, England)* **95 Suppl 2**: S91-117.

Rocha BA (2003). Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur J Pharmacol* **479**(1-3): 107-115.

Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, *et al* (1998). Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nature neuroscience* **1**(2): 132-137.

Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol* **221**(2-3): 227-234.

Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, *et al* (2001). Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* **39**(1): 32-41.

Rothman RB, Baumann MH, Prisinzano TE, Newman AH (2008a). Dopamine transport inhibitors based on GBR12909 and benztropine as potential medications to treat cocaine addiction. *Biochemical pharmacology* **75**(1): 2-16.

Rothman RB, Blough BE, Baumann MH (2008b). Dopamine/serotonin releasers as medications for stimulant addictions. *Prog Brain Res* **172**: 385-406.

Rothman RB, Grieg N, Kim A, De Costa BR, Rice KC, Carroll FI, *et al* (1992). Cocaine and GBR12909 produce equivalent motoric responses at different occupancy of the dopamine transporter. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **43**(4): 1135-1142.

Rudnick G, Clark J (1993). From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochimica et biophysica acta* **1144**(3): 249-263.

Rush CR, Essman WD, Simpson CA, Baker RW (2001). Reinforcing and subject-rated effects of methylphenidate and d-amphetamine in non-drug-abusing humans. *J Clin Psychopharmacol* **21**(3): 273-286.

Rusyniak DE (2013). Neurologic manifestations of chronic methamphetamine abuse. *The Psychiatric clinics of North America* **36**(2): 261-275.

Sagvolden T, Slatta K, Arntzen E (1988). Low doses of methylphenidate (Ritalin) may alter the delay-of-reinforcement gradient. *Psychopharmacology (Berl)* **95**(3): 303-312.

Sandler M, Ruthven CR, Goodwin BL, Reynolds GP, Rao VA, Coppen A (1980). Trace amine deficit in depressive illness: the phenylalanine connexion. *Acta psychiatrica Scandinavica Supplementum* **280**: 29-39.

Sanger DJ, Blackman DE (1976). Rate-dependent effects of drugs: a review of the literature. *Pharmacol Biochem Behav* **4**(1): 73-83.

Sass H, Soyka M, Mann K, Zieglgansberger W (1996). Relapse prevention by acamprosate. Results from a placebo-controlled study on alcohol dependence. *Archives of general psychiatry* **53**(8): 673-680.

Schenk S (2002). Effects of GBR 12909, WIN 35,428 and indatraline on cocaine self-administration and cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* **160**(3): 263-270.

Schmitz JM, Mooney ME, Moeller FG, Stotts AL, Green C, Grabowski J (2008). Levodopa pharmacotherapy for cocaine dependence: choosing the optimal behavioral therapy platform. *Drug and alcohol dependence* **94**(1-3): 142-150.

Schmitz Y, Lee CJ, Schmauss C, Gonon F, Sulzer D (2001). Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(16): 5916-5924.

See RE (2002). Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* **71**(3): 517-529.

Self DW, Karanian DA, Spencer JJ (2000). Effects of the novel D1 dopamine receptor agonist ABT-431 on cocaine self-administration and reinstatement. *Annals of the New York Academy of Sciences* **909**: 133-144.

Serrano A, Parsons LH (2011). Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther* **132**(3): 215-241.

Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A (2003). Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1003**: 36-52.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *The Journal of comparative neurology* **290**(2): 213-242.

Sesack SR, Pickel VM (1992). 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. *The Journal of comparative neurology* **320**(2): 145-160.

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

Shaham Y, Highfield D, Delfs J, Leung S, Stewart J (2000b). Clonidine blocks stress-induced reinstatement of heroin seeking in rats: an effect independent of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur J Neurosci* **12**(1): 292-302.

Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology* **168**(1-2): 3-20.

Shalev U, Grimm JW, Shaham Y (2002). Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacological reviews* **54**(1): 1-42.

Shearer J, Wodak A, van Beek I, Mattick RP, Lewis J (2003). Pilot randomized double blind placebo-controlled study of dexamphetamine for cocaine dependence. *Addiction* **98**(8): 1137-1141.

Shiffman S (1982). Relapse following smoking cessation: a situational analysis. *Journal of consulting and clinical psychology* **50**(1): 71-86.

Shiffman S, Hickcox M, Paty JA, Gnys M, Kassel JD, Richards TJ (1996). Progression from a smoking lapse to relapse: prediction from abstinence violation effects, nicotine dependence, and lapse characteristics. *Journal of consulting and clinical psychology* **64**(5): 993-1002.

Shoaib M, Swanner LS, Beyer CE, Goldberg SR, Schindler CW (1998). The GABAB agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behavioural pharmacology* **9**(3): 195-206.

Shoptaw S, Yang X, Rotheram-Fuller EJ, Hsieh YC, Kintaudi PC, Charuvastra VC, *et al* (2003). Randomized placebo-controlled trial of baclofen for cocaine dependence: preliminary effects for individuals with chronic patterns of cocaine use. *The Journal of clinical psychiatry* **64**(12): 1440-1448.

Sinha R, Catapano D, O'Malley S (1999). Stress-induced craving and stress response in cocaine dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)* **142**(4): 343-351.

Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ (2006). Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Archives of general psychiatry* **63**(3): 324-331.

Skjoldager P, Winger G, Woods JH (1993). Effects of GBR 12909 and cocaine on cocaine-maintained behavior in rhesus monkeys. *Drug and alcohol dependence* **33**(1): 31-39.

Smelson DA, Williams J, Ziedonis D, Sussner BD, Losonczy MF, Engelhart C, *et al* (2004). A double-blind placebo-controlled pilot study of risperidone for decreasing

cue-elicited craving in recently withdrawn cocaine dependent patients. *J Subst Abuse Treat* **27**(1): 45-49.

Smelson DA, Ziedonis D, Williams J, Losonczy MF, Steinberg ML, Kaune M (2006). The efficacy of olanzapine for decreasing cue-elicited craving in individuals with schizophrenia and cocaine dependence: a preliminary report. *Journal of clinical psychopharmacology* **26**(1): 9-12.

Soares BG, Lima MS, Reisser AA, Farrell M (2003). Dopamine agonists for cocaine dependence. *The Cochrane database of systematic reviews*(2): CD003352.

Sofuoglu M, Kosten TR (2005). Novel approaches to the treatment of cocaine addiction. *CNS Drugs* **19**(1): 13-25.

Sofuoglu M, Kosten TR (2006). Emerging pharmacological strategies in the fight against cocaine addiction. *Expert opinion on emerging drugs* **11**(1): 91-98.

Sofuoglu M, Sewell RA (2009). Norepinephrine and stimulant addiction. *Addict Biol* **14**(2): 119-129.

Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, *et al* (1998). Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(13): 7699-7704.

Sorge RE, Rajabi H, Stewart J (2005). Rats maintained chronically on buprenorphine show reduced heroin and cocaine seeking in tests of extinction and drug-induced reinstatement. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **30**(9): 1681-1692.

Sotnikova TD, Budygin EA, Jones SR, Dykstra LA, Caron MG, Gainetdinov RR (2004). Dopamine transporter-dependent and -independent actions of trace amine beta-phenylethylamine. *Journal of neurochemistry* **91**(2): 362-373.

Sotnikova TD, Caron MG, Gainetdinov RR (2009). Trace amine-associated receptors as emerging therapeutic targets. *Molecular pharmacology* **76**(2): 229-235.

Sotnikova TD, Zorina OI, Ghisi V, Caron MG, Gainetdinov RR (2008). Trace amine associated receptor 1 and movement control. *Parkinsonism & related disorders* **14 Suppl 2**: S99-102.

Spanagel R, Holter SM, Allingham K, Landgraf R, Zieglansberger W (1996). Acamprosate and alcohol: I. Effects on alcohol intake following alcohol deprivation in the rat. *Eur J Pharmacol* **305**(1-3): 39-44.

Spealman RD, Barrett-Larimore RL, Rowlett JK, Platt DM, Khroyan TV (1999). Pharmacological and environmental determinants of relapse to cocaine-seeking behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **64**(2): 327-336.

Spealman RD, Bergman J, Madras BK, Kamien JB, Melia KF (1992). Role of D1 and D2 dopamine receptors in the behavioral effects of cocaine. *Neurochemistry international* **20 Suppl**: 147S-152S.

Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* **24**(4): 417-463.

Spiller K, Xi ZX, Li X, Ashby CR, Jr., Callahan PM, Tehim A, *et al* (2009). Varenicline attenuates nicotine-enhanced brain-stimulation reward by activation of alpha4beta2 nicotinic receptors in rats. *Neuropharmacology* **57**(1): 60-66.

Stafford D, Rice KC, Lewis DB, Glowa JR (2000). Response requirements and unit dose modify the effects of GBR 12909 on cocaine-maintained behavior. *Exp Clin Psychopharmacol* **8**(4): 539-548.

Stahl SM (2001). Dopamine system stabilizers, aripiprazole, and the next generation of antipsychotics, part 2: illustrating their mechanism of action. *The Journal of clinical psychiatry* **62**(12): 923-924.

Stead LF, Perera R, Bullen C, Mant D, Lancaster T (2008). Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *The Cochrane database of systematic reviews*(1): CD000146.

Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**(19): 8003-8015.

Stewart J (1984). Reinstatement of heroin and cocaine self-administration behavior in the rat by intracerebral application of morphine in the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* **20**(6): 917-923.

Stewart J, Vezina P (1988). A comparison of the effects of intra-accumbens injections of amphetamine and morphine on reinstatement of heroin intravenous self-administration behavior. *Brain Res* **457**(2): 287-294.

Stolerman I (1992). Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms. *Trends in pharmacological sciences* **13**(5): 170-176.

Streeton C, Whelan G (2001). Naltrexone, a relapse prevention maintenance treatment of alcohol dependence: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Alcohol and alcoholism* **36**(6): 544-552.

Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in neurobiology* **75**(6): 406-433.

Sun W, Rebec GV (2003). Lidocaine inactivation of ventral subiculum attenuates cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci* **23**(32): 10258-10264.

Taber MT, Fibiger HC (1997). Feeding-evoked dopamine release in the nucleus, accumbens: regulation by glutamatergic mechanisms. *Neuroscience* **76**(4): 1105-1112.

Tanda G, Ebbs A, Newman AH, Katz JL (2005). Effects of 4'-chloro-3 alpha-(diphenylmethoxy)-tropane on mesostriatal, mesocortical, and mesolimbic dopamine transmission: comparison with effects of cocaine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **313**(2): 613-620.

Tanda G, Newman AH, Ebbs AL, Tronci V, Green JL, Tallarida RJ, *et al* (2009a). Combinations of cocaine with other dopamine uptake inhibitors: assessment of additivity. *J Pharmacol Exp Ther* **330**(3): 802-809.

Tanda G, Newman AH, Katz J (2009b). Discovery of Drugs to Treat Cocaine Dependence: Behavioral and Neurochemical Effects of Atypical Dopamine Transport Inhibitors. In: Enna SJ, Williams M (eds). *Contemporary Aspects of Biomedical Research: Drug Discovery*. Advances in Pharmacology. Vol 57.

Tella SR (1995). Effects of monoamine reuptake inhibitors on cocaine self-administration in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **51**(4): 687-692.

Tempesta E, Janiri L, Bignamini A, Chabac S, Potgieter A (2000). Acamprosate and relapse prevention in the treatment of alcohol dependence: a placebo-controlled study. *Alcohol and alcoholism* **35**(2): 202-209.

Thorn DA, Zhang C, Zhang Y, Li JX (2014). The trace amine associated receptor 1 agonist R05263397 attenuates the induction of cocaine behavioral sensitization in rats. *Neuroscience letters* **566**: 67-71.

Tolliver BK, Newman AH, Katz JL, Ho LB, Fox LM, Hsu K, Jr., *et al* (1999). Behavioral and neurochemical effects of the dopamine transporter ligand 4-chlorobenzotropine alone and in combination with cocaine in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **289**(1): 110-122.

Torregrossa MM, Corlett PR, Taylor JR (2011). Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of learning and memory* **96**(4): 609-623.

Tzschentke TM (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in neurobiology* **63**(3): 241-320.

Tzschentke TM (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction biology* **12**(3-4): 227-462.

Tzschentke TM, Schmidt WJ (2000). Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Critical reviews in neurobiology* **14**(2): 131-142.

Uchtenhagen A (2003). Substitution management in opioid dependence. *J Neural Transm Suppl*(66): 33-60.

Ukairo OT, Bondi CD, Newman AH, Kulkarni SS, Kozikowski AP, Pan S, *et al* (2005). Recognition of benztropine by the dopamine transporter (DAT) differs from that of the classical dopamine uptake inhibitors cocaine, methylphenidate, and mazindol as a function of a DAT transmembrane 1 aspartic acid residue. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **314**(2): 575-583.

Vaughan RA, Agoston GE, Lever JR, Newman AH (1999). Differential binding of tropane-based photoaffinity ligands on the dopamine transporter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(2): 630-636.

Vaughan RA, Sakrikar DS, Parnas ML, Adkins S, Foster JD, Duval RA, *et al* (2007). Localization of cocaine analog [¹²⁵I]RTI 82 irreversible binding to transmembrane domain 6 of the dopamine transporter. *The Journal of biological chemistry* **282**(12): 8915-8925.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, Merino V, Carda M, *et al* (2009). The dopamine uptake inhibitor 3 alpha-[bis(4'-

fluorophenyl]metoxy]-tropane reduces cocaine-induced early-gene expression, locomotor activity, and conditioned reward. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**(12): 2497-2507.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Murga J, Carda M, Canales JJ (2010a). The high affinity dopamine uptake inhibitor, JHW 007, blocks cocaine-induced reward, locomotor stimulation and sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**(7): 501-508.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Ramos-Miguel A, Garcia-Sevilla JA, Canales JJ (2012). Substituting a long-acting dopamine uptake inhibitor for cocaine prevents relapse to cocaine seeking. *Addict Biol*.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Renau-Piqueras J, Canales JJ (2010b). Therapeutic-like properties of a dopamine uptake inhibitor in animal models of amphetamine addiction. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **14**(5): 655-665.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Renau-Piqueras J, Canales JJ (2011). Therapeutic-like properties of a dopamine uptake inhibitor in animal models of amphetamine addiction. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **14**(5): 655-665.

Velazquez-Sanchez C, Garcia-Verdugo JM, Murga J, Canales JJ (2013). The atypical dopamine transport inhibitor, JHW 007, prevents amphetamine-induced sensitization and synaptic reorganization within the nucleus accumbens. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **44**: 73-80.

Ventura R, Cabib S, Alcaro A, Orsini C, Puglisi-Allegra S (2003). Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(5): 1879-1885.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Franceschi D, Sedler M, *et al* (2001). Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *J Neurosci* **21**(23): 9414-9418.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2002). Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behavioural pharmacology* **13**(5-6): 355-366.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003). The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* **111**(10): 1444-1451.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2004). The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 3-13.

Volkow ND, Gatley SJ, Fowler JS, Logan J, Fischman M, Gifford AN, *et al* (1996a). Cocaine doses equivalent to those abused by humans occupy most of the dopamine transporters. *Synapse* **24**(4): 399-402.

Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin R, Fowler JS, Franceschi D, *et al* (2000). Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life sciences* **67**(12): 1507-1515.

Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, *et al* (1997). Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* **386**(6627): 827-830.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Ding YS, Logan J, *et al* (1996b). Relationship between psychostimulant-induced "high" and dopamine transporter occupancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(19): 10388-10392.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, *et al* (1999). Blockade of striatal dopamine transporters by intravenous methylphenidate is not sufficient to induce self-reports of "high". *J Pharmacol Exp Ther* **288**(1): 14-20.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Learned-Coughlin S, Yang J, Logan J, *et al* (2005). The slow and long-lasting blockade of dopamine transporters in human brain induced by the new antidepressant drug radafaxine predict poor reinforcing effects. *Biol Psychiatry* **57**(6): 640-646.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(37): 15037-15042.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, *et al* (2006). Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine

addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(24): 6583-6588.

Volpicelli JR (1995). Naltrexone in alcohol dependence. *Lancet* **346**(8973): 456.

Volz TJ, Fleckenstein AE, Hanson GR (2007). Methamphetamine-induced alterations in monoamine transport: implications for neurotoxicity, neuroprotection and treatment. *Addiction* **102 Suppl 1**: 44-48.

Wagner FA, Anthony JC (2002). From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* **26**(4): 479-488.

Wainscott DB, Little SP, Yin T, Tu Y, Rocco VP, He JX, *et al* (2007). Pharmacologic characterization of the cloned human trace amine-associated receptor1 (TAAR1) and evidence for species differences with the rat TAAR1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **320**(1): 475-485.

Walsh SL, Haberny KA, Bigelow GE (2000). Modulation of intravenous cocaine effects by chronic oral cocaine in humans. *Psychopharmacology* **150**(4): 361-373.

Wang B, Luo F, Zhang WT, Han JS (2000). Stress or drug priming induces reinstatement of extinguished conditioned place preference. *Neuroreport* **11**(12): 2781-2784.

Wang B, Shaham Y, Zitzman D, Azari S, Wise RA, You ZB (2005). Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *J Neurosci* **25**(22): 5389-5396.

Wang GJ, Smith L, Volkow ND, Telang F, Logan J, Tomasi D, *et al* (2012). Decreased dopamine activity predicts relapse in methamphetamine abusers. *Molecular psychiatry* **17**(9): 918-925.

Wee S, Anderson KG, Baumann MH, Rothman RB, Blough BE, Woolverton WL (2005). Relationship between the serotonergic activity and reinforcing effects of a series of amphetamine analogs. *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2): 848-854.

Weinshenker D, Miller NS, Blizinsky K, Laughlin ML, Palmiter RD (2002). Mice with chronic norepinephrine deficiency resemble amphetamine-sensitized animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(21): 13873-13877.

Weiss F, Maldonado-Vlaar CS, Parsons LH, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O (2000). Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4321-4326.

Weiss F, Markou A, Lorang MT, Koob GF (1992). Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain research* **593**(2): 314-318.

Weiss SR, Post RM, Pert A, Woodward R, Murman D (1989). Context-dependent cocaine sensitization: differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol Biochem Behav* **34**(3): 655-661.

Wikler A (1973). Dynamics of drug dependence. Implications of a conditioning theory for research and treatment. *Archives of general psychiatry* **28**(5): 611-616.

Wilcox KM, Lindsey KP, Votaw JR, Goodman MM, Martarello L, Carroll FI, *et al* (2002). Self-administration of cocaine and the cocaine analog RTI-113: relationship to dopamine transporter occupancy determined by PET neuroimaging in rhesus monkeys. *Synapse* **43**(1): 78-85.

Willner P (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **83**(1): 1-16.

Wise RA (1980). Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol Biochem Behav* **13 Suppl 1**: 213-223.

Wise RA, Rompre PP (1989). Brain dopamine and reward. *Annual review of psychology* **40**: 191-225.

Wolf ME, Dahlin SL, Hu XT, Xue CJ, White K (1995). Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: comparison with N-methyl-D-aspartate antagonists. *Neuroscience* **69**(2): 417-439.

Wolf ME, Jeziorski M (1993). Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioral sensitization. *Brain Res* **613**(2): 291-294.

Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004). Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 61-79.

Wolinsky TD, Swanson CJ, Smith KE, Zhong H, Borowsky B, Seeman P, *et al* (2007). The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia. *Genes, brain, and behavior* **6**(7): 628-639.

Woolverton WL (1987). Evaluation of the role of norepinephrine in the reinforcing effects of psychomotor stimulants in rhesus monkeys. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **26**(4): 835-839.

Woolverton WL, Hecht GS, Agoston GE, Katz JL, Newman AH (2001). Further studies of the reinforcing effects of benztropine analogs in rhesus monkeys. *Psychopharmacology* **154**(4): 375-382.

Woolverton WL, Johnson KM (1992). Neurobiology of cocaine abuse. *Trends in pharmacological sciences* **13**(5): 193-200.

Woolverton WL, Rowlett JK, Wilcox KM, Paul IA, Kline RH, Newman AH, *et al* (2000). 3'- and 4'-chloro-substituted analogs of benztropine: intravenous self-administration and in vitro radioligand binding studies in rhesus monkeys. *Psychopharmacology* **147**(4): 426-435.

Xi ZX, Baker DA, Shen H, Carson DS, Kalivas PW (2002a). Group II metabotropic glutamate receptors modulate extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **300**(1): 162-171.

Xi ZX, Ramamoorthy S, Baker DA, Shen H, Samuvel DJ, Kalivas PW (2002b). Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **303**(2): 608-615.

Xie X, Lasseter HC, Ramirez DR, Ponds KL, Wells AM, Fuchs RA (2012). Subregion-specific role of glutamate receptors in the nucleus accumbens on drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Addiction biology* **17**(2): 287-299.

Xie X, Ramirez DR, Lasseter HC, Fuchs RA (2010). Effects of mGluR1 antagonism in the dorsal hippocampus on drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **208**(1): 1-11.

Xie Z, Miller GM (2007a). Trace amine-associated receptor 1 is a modulator of the dopamine transporter. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **321**(1): 128-136.

Xie Z, Miller GM (2009). Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochemical pharmacology* **78**(9): 1095-1104.

Xie Z, Westmoreland SV, Bahn ME, Chen GL, Yang H, Vallender EJ, *et al* (2007b). Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **321**(1): 116-127.

Xie Z, Westmoreland SV, Miller GM (2008). Modulation of monoamine transporters by common biogenic amines via trace amine-associated receptor 1 and monoamine autoreceptors in human embryonic kidney 293 cells and brain synaptosomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **325**(2): 629-640.

Zaczek R, Culp S, De Souza EB (1991). Interactions of [3H]amphetamine with rat brain synaptosomes. II. Active transport. *J Pharmacol Exp Ther* **257**(2): 830-835.

Zahm DS (1999). Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Annals of the New York Academy of Sciences* **877**: 113-128.

Zeng Z, Fan P, Rand E, Kyaw H, Su K, Madike V, *et al* (1998). Cloning of a putative human neurotransmitter receptor expressed in skeletal muscle and brain. *Biochemical and biophysical research communications* **242**(3): 575-578.

Zhou W, Kalivas PW (2008). N-acetylcysteine reduces extinction responding and induces enduring reductions in cue- and heroin-induced drug-seeking. *Biological psychiatry* **63**(3): 338-340.

Ziolkowska B, Kielbinski M, Gieryk A, Soria G, Maldonado R, Przewlocki R (2011). Regulation of the immediate-early genes *arc* and *zif268* in a mouse operant model of cocaine seeking reinstatement. *Journal of neural transmission* **118**(6): 877-887.

Zorrilla EP, Wee S, Zhao Y, Specio S, Boutrel B, Koob GF, *et al* (2012). Extended access cocaine self-administration differentially activates dorsal raphe and amygdala corticotropin-releasing factor systems in rats. *Addiction biology* **17**(2): 300-308.

Zou MF, Cao J, Kopajtic T, Desai RI, Katz JL, Newman AH (2006). Structure-activity relationship studies on a novel series of (S)-2beta-substituted 3alpha-[bis(4-fluoro- or 4-chlorophenyl)methoxy]tropane analogues for in vivo investigation. *Journal of medicinal chemistry* **49**(21): 6391-6399.

ANEXO

Publicaciones relacionadas con la tesis

A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat.

Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Hernández-Rabaza V, Nácher A, Merino V, Cardá M, Murga J, Canales JJ.
Psychopharmacology (Berl). 2009

Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics.

Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Sotnikova TD, Morairty SR, Harmeyer A, Groebke Zbinden K, Norcross RD, Bradaia A, Kilduff TS, Biemans B, Pouzet B, Caron MG, Canales JJ, Wallace TL, Wettstein JG, Hoener MC.
Biol Psychiatry. 2012

Substituting a long-acting dopamine uptake inhibitor for cocaine prevents relapse to cocaine seeking.

Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Ramos-Miguel A, García-Sevilla JA, Canales JJ.
Addict Biol. 2013

Modulation of methamphetamine's locomotor stimulation and self-administration by JHW 007, an atypical dopamine reuptake blocker.

Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Canales JJ.
Eur J Pharmacol. 2014

Participación en otras publicaciones

The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward.

Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ.

Neurobiol Learn Mem. 2008

Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal.

Hernández-Rabaza V, Llorens-Martín M, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Arcusa A, Gumus HG, Gómez-Pinedo U, Pérez-Villalba A, Roselló J, Trejo JL, Barcia JA, Canales JJ.

Neuroscience. 2009

The dopamine uptake inhibitor 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)metoxy]-tropane reduces cocaine-induced early-gene expression, locomotor activity, and conditioned reward.

Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Hernández-Rabaza V, Náchter A, Merino V, Cardá M, Murga J, Canales JJ.

Neuropsychopharmacology. 2009

Enhanced habit-based learning and decreased neurogenesis in the adult hippocampus in a murine model of chronic social stress.

Ferragud A, Haro A, Sylvain A, Velázquez-Sánchez C, Hernández-Rabaza V, Canales JJ.

Behav Brain Res. 2010

The high affinity dopamine uptake inhibitor, JHW 007, blocks cocaine-induced reward, locomotor stimulation and sensitization.

Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Murga J, Cardá M, Canales JJ.

Eur Neuropsychopharmacol. 2010

Therapeutic-like properties of a dopamine uptake inhibitor in animal models of amphetamine addiction.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Renau-Piqueras J, Canales JJ.

Int J Neuropsychopharmacol. 2011

Neurotoxicity and persistent cognitive deficits induced by combined MDMA and alcohol exposure in adolescent rats.

Hernandez-Rabaza V, Navarro-Mora G, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Marin MP, Garcia-Verdugo JM, Renau-Piqueras J, Canales JJ.

Addict Biol. 2010

Exposure to N-ethyl-N-nitrosourea in adult mice alters structural and functional integrity of neurogenic sites.

Capilla-Gonzalez V, Gil-Perotin S, Ferragud A, Bonet-Ponce L, Canales JJ, Garcia-Verdugo JM.

PLoS One. 2012

