



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Facultad de Psicología

Departamento de Psicobiología

Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias

*Programa de Doctorado: Investigación en Psicología R.D. 99/2011*

**EFFECTOS A LARGO PLAZO DE LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL  
Y A LA COCAÍNA DURANTE LA ADOLESCENCIA EN  
MODELOS ANIMALES: FACTORES DE RIESGO Y POSIBLES  
TRATAMIENTOS EN LA ADICCIÓN A LA COCAÍNA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Ana Mateos García

Dirigida por:

M.Carmen Arenas Fenollar

Carmen Manzanedo Pérez

José Miñarro López

Valencia, Octubre 2016





Las Dras. M. Carmen Arenas Fenollar y Carmen Manzanedo Pérez, Profesoras Titulares de Psicobiología y el Dr. José Miñarro López, Catedrático de Psicobiología, y pertenecientes a la Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, del Departamento de Psicobiología de la Universitat de Valencia,

#### CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Ana Mateos García, con el título “Efectos a largo plazo de la exposición al alcohol y a la cocaína durante la adolescencia en modelos animales: factores de riesgo y posibles tratamientos en la adicción a la cocaína” ha sido realizada bajo su dirección. Tras haberla examinado hacen constar su autorización para que se realicen los trámites conducentes a su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia a 24 de Octubre de 2016.

Fdo.: M. Carmen Arenas Fenollar

Fdo.: Carmen Manzanedo Pérez

Fdo.: José Miñarro López





*A mis padres, Santiago y Manuela.*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, la Dra. M.Carmen Arenas, la Dra. Carmen Manzanedo y el Dr. José Miñarro, toda la ayuda y enseñanzas prestadas durante estos años.

Carmen y M.Carmen, gracias por atenderme y apoyarme siempre en todo, y por confiar en mí años atrás para comenzar esta andadura. Muchísimas gracias por el tiempo invertido (tanto dentro como fuera del laboratorio), ya que ha sido esencial para la finalización de este trabajo. Pepe, gracias también por la confianza otorgada, por los consejos, y por permitirme unirme al grupo de investigación, del que tanto he aprendido. Muchísimas gracias a los tres.

También quiero agradecer a la Dra. Marta Rodríguez y a la Dra. Asunción Aguilar todos los consejos otorgados durante estos años, y por poner siempre a disposición vuestro gran saber, de vosotras también he aprendido mucho. Muchas gracias Marta y Sunsi.

Quisiera agradecer a la Dra. Olga Valverde el buen acogimiento que ella y todas las chicas de su equipo me dieron durante las tres semanas que pasé con ellas en el PRBB perfeccionando mis conocimientos en la técnica de autoadministración intravenosa. Gracias por poner todos vuestros medios, conocimientos y amabilidad para enseñarme. Gracias Olga.

Así mismo, quisiera agradecer a la Dra. Ana Díaz y su equipo toda la ayuda prestada durante el tiempo que estuve en la UCIM realizando mis experimentos, y sobre todo por el apoyo brindado durante las largas horas de cirugía. Gracias Ana.

Quiero agradecer de corazón a todas las personas con las que he convivido durante estos años. Tras muchas horas de laboratorio y despacho puedo decir que he aprendido mucho de todos vosotros, y

que además he disfrutado mucho de vuestra compañía, haciendo el día a día súper agradable. Gracias por vuestra ayuda y compañerismo. Concha, Conchi, César, Ester, Federica, Ferrán, Juan Carlos, Manu, Mipu, Sonia y Xin. Además, quisiera agradecer de manera especial a Maca, Pilar, Sandra, y más recientemente llegadas Carmen y Marina, todo el apoyo, los consejos, los momentos y las risas. Sabéis que os quiero.

Por último, mi mayor agradecimiento se lo debo a mi familia, especialmente a mi madre, a Mónica, a Lucas y a Yaiza. Sois mi fuerza y mi debilidad. Gracias por estar en los buenos y en los malos momentos, y por enseñarme que no pierde el que se cae, sino aquel que no se levanta. OS QUIERO.

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la ayuda de:

-MINECO, Instituto de Salud Carlos III, Red de Trastornos Adictivos (RTA) RD12/0028/0005 and Unión Europea, Fondos FEDER “una manera de hacer Europa” 

-The European Foundation for Alcohol Research (ERAB), EA13 08.

-Generalitat Valenciana, PROMETEOII/2014/063.

-Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas, Proyectos de Investigación sobre Drogodependencias, 2014I007.



## RESUMEN

El primer contacto con las drogas se produce mayoritariamente en la adolescencia, pero la transición del uso voluntario a la dependencia, desarrollando un trastorno por el uso de sustancias, solo se manifiesta en un cierto porcentaje de individuos. El presente trabajo evalúa la influencia que a largo plazo presentan ciertas variables ambientales, individuales y biológicas durante la adolescencia, sobre la vulnerabilidad a los efectos reforzantes de la cocaína y su nivel de consumo en sujetos adultos. Concretamente, hemos comprobado cómo la exposición durante la adolescencia al alcohol o cocaína en forma de *binge*, el nivel del rasgo de personalidad de búsqueda de la novedad, o la pertenencia al género masculino o femenino, influyen en la Autoadministración de cocaína y en la adquisición del Condicionamiento de Preferencia de Lugar (CPL) inducido por la cocaína u otras drogas en los ratones evaluados durante la etapa adulta. Además, dado que hoy por hoy no existe una terapia farmacológica eficaz para el tratamiento de la dependencia a la cocaína, el presente trabajo comprueba la capacidad del topiramato, un fármaco anticonvulsivante, para bloquear los efectos reforzantes de la cocaína. Así, hemos evaluado ratones adultos expuestos a diferentes patrones de administración de topiramato en la adquisición, expresión, extinción y reinstauración del CPL inducido con diferentes dosis de cocaína. Los principales resultados obtenidos indican que la exposición a un consumo intensivo de drogas durante la adolescencia, el alto nivel de búsqueda de la novedad y la pertenencia al sexo femenino, aumentan a largo plazo la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína, así como su consumo, en la etapa adulta. Nuestros resultados indican que el topiramato potencia el efecto reforzante y la conducta de búsqueda de la cocaína, por lo que no parece recomendable su uso en el tratamiento de la adicción a la cocaína.

Palabras clave: cocaína, CPL, AA, adolescencia, vulnerabilidad, ratones machos y hembras, topiramato.





## **ABSTRACT**

The first contact with drugs occurs mostly during adolescence, but transition from voluntary use to dependence is observed only in a certain percentage of individuals, who develop a substance use disorder. The present study evaluates the long-term effects of different environmental, individual and biological variables during adolescence on the vulnerability to the rewarding effects of cocaine in adult subjects. Specifically, we evaluated the impact that exposure to alcohol or cocaine binge during adolescence, the level of novelty seeking, or belonging to the male or female gender, can have on cocaine self-administration and acquisition of Conditioned Place Preference (CPP) induced by cocaine or other drugs in mice, during adulthood. In addition, nowadays no specific effective pharmacological treatment exists for cocaine dependence. For this reason, this study evaluates the efficacy of topiramate, an anticonvulsant drug, in blocking the rewarding effects of cocaine. Therefore, adult mice exposed to different patterns of topiramate administration were evaluated in the acquisition, expression, extinction and reinstatement of CPP induced by different doses of cocaine. The results showed that adolescent drug pre-exposure, high novelty seeking, and being female, increased the long-term sensitivity to the rewarding effects of cocaine, as well as the consumption level in adulthood. Our results showed that topiramate increases the rewarding properties of cocaine and drug seeking behavior, suggesting its use is not recommendable for cocaine- dependent patients.

Keywords: cocaine, CPP, SA, adolescence, vulnerability, male and female mice, topiramate.



## ÍNDICE

<b>1. Introducción general.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Adicción a la cocaína.....</b>	<b>29</b>
2.1. Historia de la cocaína.....	31
2.2. Epidemiología de la cocaína.....	33
2.3. Estructura y farmacología.....	36
2.3.1. Efectos a corto plazo de la cocaína.....	38
2.3.2. Efectos a largo plazo de la cocaína.....	40
2.4. La cocaína y el sistema cerebral de la recompensa.....	40
<b>3. Factores de riesgo en la adicción.....</b>	<b>45</b>
3.1. Adolescencia y consumo de drogas.....	47
3.2. Búsqueda de la novedad como factor de vulnerabilidad.....	53
3.3. Consumo previo de drogas en el desarrollo de la adicción.....	61
3.4. Diferencias de sexo en la adicción a las drogas.....	68
<b>4. Tratamiento farmacológico de la adicción a la cocaína.....</b>	<b>75</b>
<b>5. Modelos animales para el estudio de la adicción a las drogas.....</b>	<b>93</b>
5.1. Principales paradigmas en la evaluación del refuerzo.....	96
5.1.1. Autoadministración.....	96
5.1.2. Condicionamiento de Preferencia de Lugar.....	99
5.2. Pruebas conductuales para evaluar otros efectos de las drogas .....	101
5.2.1. <i>Hole-board</i> .....	102
5.2.2. Actividad motora.....	103
5.2.3. Test de interacción social.....	104
5.2.4. Laberinto elevado en cruz (LEC).....	106
<b>6. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>109</b>
6.1. Hipótesis general.....	111
6.2. Objetivo general.....	112
6.3. Objetivos específicos.....	112
<b>7. Metodología y resultados.....</b>	<b>115</b>
7.1. Estudio 1.....	117
7.1.1. Introducción.....	117
7.1.2. Material y métodos.....	122
7.1.2.1. Sujetos experimentales.....	122
7.1.2.2. Tratamiento farmacológico.....	123

7.1.3. Aparatos y procedimiento.....	125
7.1.3.1. Test <i>hole-board</i> .....	125
7.1.3.2. Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC).....	126
7.1.3.3. Actividad motora espontánea.....	127
7.1.3.4. Prueba de interacción social.....	128
7.1.3.5. Condicionamiento de preferencia de lugar.....	129
7.1.4. Diseño experimental.....	132
7.1.5. Análisis estadísticos.....	134
7.1.6. Resultados.....	136
7.1.6.1. Test de <i>hole-board</i> .....	136
7.1.6.2. Test del laberinto elevado en cruz.....	138
7.1.6.3. Actividad locomotora espontánea.....	138
7.1.6.4. Test de interacción social.....	140
7.1.6.5. Condicionamiento de preferencia de lugar.....	143
7.1.6.5.1. CPL inducido con MDMA.....	143
7.1.6.5.2. CPL inducido con cocaína.....	145
7.1.7. Discusión.....	147
7.1.8. Artículo original.....	159
7.2. Estudio 2.....	173
7.2.1. Introducción.....	173
7.2.2. Material y métodos.....	178
7.2.2.1. Sujetos experimentales.....	178
7.2.2.2. Tratamiento farmacológico.....	179
7.2.3. Aparatos.....	180
7.2.4. Diseño experimental y procedimientos.....	182
7.2.4.1. Pre-exposición al etanol.....	182
7.2.4.2. Experimento 1.....	183
7.2.4.3. Experimento 2.....	184
7.2.4.4. Procedimiento de CPL.....	186
7.2.4.5. Procedimiento de auto-administración.....	187
7.2.5. Análisis estadísticos.....	191
7.2.6. Resultados.....	193
7.2.7. Discusión.....	202
7.2.8. Artículo original.....	213
7.3. Estudio 3.....	227
7.3.1. Introducción.....	227
7.3.2. Material y métodos.....	230
7.3.2.1. Sujetos experimentales.....	230

7.3.2.2. Tratamiento farmacológico.....	231
7.3.2.3. Aparatos.....	232
7.3.3. Procedimientos.....	232
7.3.3.1. Procedimiento de CPL.....	232
7.3.3.2. PCR en tiempo real.....	235
7.3.4. Diseño experimental.....	236
7.3.4.1. Experimento 1.....	237
7.3.4.2. Experimento 2.....	239
7.3.4.3. Experimento 3.....	240
7.3.5. Análisis estadísticos.....	241
7.3.6. Resultados.....	243
7.3.7. Discusión.....	252
7.3.8. Artículo original.....	261
<b>8. Discusión general.....</b>	<b>273</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>287</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>293</b>



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Autoadministración.
<b>Altos/bajos-NS</b>	Altos/bajos <i>Novelty Seekers</i> , buscadores de la novedad.
<b>ATV</b>	Área tegmental ventral.
<b>BA</b>	Brazos abiertos.
<b>BC</b>	Brazos cerrados.
<b>COC</b>	Cocaína.
<b>COF</b>	Corteza orbitofrontal medial.
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal.
<b>CPL</b>	Condicionamiento de la preferencia de lugar.
<b>DA</b>	Dopamina.
<b>DAT</b>	Transportador de la DA.
<b>EDADES</b>	Encuesta Domiciliaria sobre Abuso de Drogas.
<b>EMCDDA</b>	Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías.
<b>ESTUDES</b>	Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias
<b>EtOH</b>	Etanol.
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> , EE.UU.
<b>FR</b>	Ratio fija.
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico.
<b>HNS</b>	Altos buscadores de la novedad.

<b>L-dopa</b>	Levodopa.
<b>LEC</b>	Laberinto elevado en cruz.
<b>LNS</b>	Bajos buscadores de la novedad.
<b>MDMA</b>	3,4-metilendioximetanfetamina, éxtasis.
<b>NAcc</b>	Núcleo Acumbens.
<b>NIAAA</b>	<i>National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, EE.UU.</i>
<b>NS</b>	<i>Novelty seeking</i> , búsqueda de la novedad.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PND</b>	<i>Post natal days</i> , días después de nacer.
<b>Post-C</b>	Post-Condicionamiento.
<b>PR</b>	Ratio progresiva.
<b>Pre-C</b>	Pre-Condicionamiento.
<b>SAL</b>	Solución salina.
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa.
<b>TPM</b>	Topiramato.
<b>UNODC</b>	<i>United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report.</i>
<b>VEH</b>	Vehículo.



# 1. Introducción general



El uso de la cocaína y del alcohol es bastante común en nuestra sociedad, y aunque gran cantidad de personas usan estas drogas de forma esporádica, no todas desarrollan un consumo compulsivo de las mismas. Solo un cierto porcentaje de individuos presenta importantes problemas asociados al consumo de drogas, y manifiestan trastornos provocados por su uso. Estos experimentan la transición del uso voluntario de estas drogas a la dependencia por las mismas. Dicha dependencia se caracteriza por la ausencia de control en el consumo de la droga y por el aumento de la vulnerabilidad ante una recaída tras un periodo de abstinencia. Se ha observado que un contacto previo con las drogas de abuso puede propiciar una mayor o menor sensibilización a largo plazo dependiendo del individuo. Por tanto, nos preguntamos ¿qué puede estar marcando estas diferencias en la respuesta a las sustancias de abuso? Variables ambientales, individuales y biológicas parecen estar contribuyendo en la transición desde un consumo voluntario a la dependencia y a la adicción. Por ello, resulta esencial el estudio de los factores de vulnerabilidad que pueden estar modulando dicha transición, afectando a los efectos reforzantes de drogas como la cocaína o la MDMA. De esta manera podremos encontrar herramientas para prevenir un consumo compulsivo de las drogas, que ayuden a abandonar su consumo y mantener la abstinencia a largo plazo.

## ***Introducción***

La adolescencia es un periodo temporal en el desarrollo del individuo caracterizado por la aparición y el aumento de conductas de exploración y, habitualmente, de comportamientos de alto riesgo; por lo que es el momento donde con mayor frecuencia se inician los jóvenes en el consumo de las drogas (Chen y Kandel, 1995). En este periodo ontogénico, el sistema nervioso central está en desarrollo y experimenta muchos cambios. Por ello, el impacto del consumo de sustancias psicoactivas durante la adolescencia va a tener una repercusión a largo plazo en el desarrollo del comportamiento y de los procesos cognitivos, resultando clave en el aumento y mantenimiento del consumo de drogas en la edad adulta (Spear, 2000; Spear y Varlinskaya, 2005). Así, esta etapa se considera el periodo biológico de mayor vulnerabilidad para la experimentación con sustancias de abuso y la adquisición de trastornos de abuso de sustancias (Chambers y cols., 2003; Hibell y cols., 2011).

Es de gran interés obtener marcadores que puedan discriminar a los sujetos más vulnerables ante el contacto con las drogas, para poder prevenir su consumo. Deben investigarse las características de personalidad que pueden predisponer al abuso de drogas en los individuos. Una de estas características es el rasgo de búsqueda de la novedad (*novelty seeking*, NS), que en humanos hace referencia también a la búsqueda de sensaciones o experiencias nuevas y variadas, en ocasiones experiencias arriesgadas o peligrosas

(Zuckerman y Kuhlman, 2000). Además, es conocido que tanto el inicio como el consumo de las drogas y la vulnerabilidad a desarrollar un trastorno por uso de sustancia es diferente en varones que en mujeres (Sanchis-Segura y Becker, 2016).

La presente Tesis Doctoral pretende evaluar algunos factores que predisponen a los sujetos a desarrollar un consumo compulsivo de las drogas, especialmente a la cocaína tras su contacto con ellas. En primer lugar, en el Estudio 1 pretendemos demostrar que la administración de cocaína durante la adolescencia es un factor que aumentará la vulnerabilidad a las drogas en la edad adulta, sobre todo entre los ratones altos buscadores de la novedad, endofenotipo considerado como factor de vulnerabilidad en el inicio al consumo de las drogas de abuso.

En segundo lugar, pretendemos evaluar las consecuencias a largo plazo que tiene el consumo intensivo de alcohol entre los adolescentes. Habitualmente, el alcohol actúa de puerta de acceso al futuro consumo de otras drogas de abuso, dado su carácter legal y el fácil acceso por parte de los jóvenes. Se ha producido una tendencia al consumo intensivo e intermitente de alcohol en forma de “atracones”, denominado también “consumo de borrachera” o *binge drinking*. Además, concretamente entre los jóvenes adolescentes se está apreciando una equiparación del consumo de alcohol de las mujeres

## ***Introducción***

con respecto a los hombres. Este aumento del consumo de alcohol observado entre las chicas adolescentes resulta preocupante, dado que la literatura nos indica como el género femenino puede ser más vulnerable a los efectos nocivos de las drogas de abuso, una vez ha comenzado el consumo. De acuerdo a todo ello, el Estudio 2 de la presente Tesis Doctoral pretende averiguar si una administración intensiva de etanol durante la adolescencia produce a largo plazo un aumento en la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína, así como observar si altera el nivel de consumo de la misma, sobre todo en ratones hembras.

Por último, teniendo en cuenta cómo dichos factores de vulnerabilidad propician el posterior desarrollo de una adicción a la cocaína, también hemos considerado relevante evaluar fármacos con potencial terapéutico en el tratamiento de la dependencia a la cocaína. Hasta el momento, no existe un tratamiento farmacológico eficaz aprobado para la dependencia a la cocaína (Kim y Lawrence, 2014), por lo que consideramos una tarea de primer orden obtener herramientas que ayuden a mantener la abstinencia a largo plazo. Se ha investigado el uso de diferentes fármacos con potencial terapéutico en el tratamiento de la dependencia a la cocaína (Gass y Olive, 2008), que han mostrado cierta eficacia especialmente cuando se han administrado junto con psicoterapia cognitivo-conductual (Kim y Lawrence, 2014).

Con este objetivo se está evaluando, entre otros, un fármaco con perfil anticonvulsivo, el topiramato, el cual, según indican algunos estudios, podría atenuar las propiedades reforzantes de la cocaína dado que ha mostrado ciertos efectos positivos en el tratamiento de la dependencia al alcohol. Por ello, el tercer y último estudio de la presente Tesis Doctoral es poner a prueba la utilidad de la administración del fármaco topiramato para bloquear los efectos reforzantes de la cocaína en el condicionamiento de preferencia de lugar.

Esperamos que los resultados de la presente Tesis Doctoral, desde la investigación básica con modelos animales, contribuyan a dilucidar los factores implicados en el desarrollo de los trastornos ocasionados por las drogas, y además, aporten nuevas perspectivas para su tratamiento.





## 2. Cocaína



El uso crónico de la cocaína es un gran problema de salud pública a nivel mundial. Ya sea inhalada, inyectada o fumada como crack, sus consumidores sufren graves consecuencias negativas para su salud, relaciones sociales, así como importantes dificultades económicas. A pesar de los esfuerzos para desarrollar tratamientos eficaces, tanto farmacológicos, cognitivos o conductuales, la probabilidad de sufrir una recaída es alarmantemente alta.

## **2.1 Historia de la cocaína**

La cocaína es una sustancia de origen natural que se encuentra en las hojas de la planta de coca *Erythroxylum* y tiene como origen América del Sur, México, Indonesia y las Indias Occidentales (Mallette y cols., 2016). Los pueblos de las civilizaciones antiguas emplearon las hojas de coca principalmente por motivos religiosos, ceremoniales y terapéuticos. Utilizando una mezcla de hojas de coca y saliva como anestésico local practicaban trepanaciones cerebrales, las cuales consistían en la eliminación de una sección circular de los huesos del cráneo, como solución a posibles enfermedades, traumas en la cabeza, o rituales. Tras la conquista del “nuevo mundo”, ya en el siglo XV, los colonizadores necesitaron nativos para trabajar en las minas de plata; arduo trabajo donde el consumo de coca ayudaba a paliar el esfuerzo de la tarea gracias a sus efectos, tales como la reducción del apetito, o el aumento de la resistencia física. Esta situación provocó un gran

## ***Cocaína***

aumento del uso de las hojas de coca y del número de “coqueros” (masticadores de coca). No fue hasta mediado del siglo XIX, cuando un estudiante de doctorado en Alemania logró aislar el alcaloide que provocaba los efectos psicoactivos que tenía la planta: la cocaína. En 1884, fue utilizada por primera vez como anestésico, y a finales del siglo XIX, la cocaína ya era muy conocida por sus propiedades analgésicas. En 1885 se comercializaron diversas formas de cocaína, incluyendo el polvo, los cigarrillos, e incluso una mezcla de cocaína inyectable. Pasó a ser un ingrediente añadido en los vinos, y esta mezcla fue muy bien recibida por primeros ministros, la realeza, e incluso el Papa. Utilizando el etanol del vino como disolvente y la cocaína de las hojas de la coca se originaron bebidas “vigorizantes”. Estas bebidas fueron competencia directa de otras no alcohólicas; es el caso de la receta original de la Coca-Cola, la cual fue patentada en forma de jarabe como medicina para el dolor de cabeza, que también se promocionó y vendió como una bebida “energizante” con las virtudes de la coca pero sin los problemas del alcohol. Esta nueva bebida se hizo muy popular y no fue hasta 1906, cuando se aprueba la Ley de Drogas y Alimentos, que la compañía eliminó la cocaína como ingrediente en la fórmula, utilizando hojas descocainizadas. En los EE.UU., el uso de la cocaína se generalizó utilizándose en tónicos, en caramelos para el dolor de muelas, e incluso se comercializaron tabletas de chocolate con cocaína. Se aconsejaba al público su consumo con eslóganes que indicaban que "podría convertir al

cobarde en valiente, al callado en elocuente y al paciente en insensible al dolor". Se vendió sin receta médica hasta 1916, momento en que las propiedades adictivas de la cocaína empezaron a ser conocidas, por lo que su uso y comercialización pasaron a ser ilegales (Goldstein, 2009).

## **2.2. Epidemiología de la cocaína**

La cocaína es la droga estimulante ilegal más consumida en Europa, siendo su mayor consumo en el sur y el oeste de Europa (EMCDDA, 2016), aunque se ha observado que su prevalencia anual ha declinado en Europa y América del Norte durante los últimos años (UNODC World Drug Report, 2016). A nivel europeo, se estima que el 1.9 % de adultos jóvenes de entre 15 a 34 años consumieron cocaína en el último año, siendo los contextos recreativos el ambiente de consumo más habitual, como indica el aumento de consumo durante los fines de semana y las vacaciones. Es de señalar que el 70 % de los consumidores de cocaína se concentran en tres países: España, Italia y Reino Unido. De los países europeos, España es el país en el que se incauta más cocaína, y es el segundo con mayor prevalencia de consumo de este psicoestimulante (ver Figura 1) (EMCDDA, 2016).

Por otro lado, si observamos las encuestas propias de España, el porcentaje asciende a un 3.5% de los jóvenes de entre 14 y 18 años, los cuales reconocieron haber consumido cocaína (polvo y/o base) al

## Cocaína

menos alguna vez en su vida, y siendo mayor la prevalencia en el consumo en los hombres frente a las mujeres adolescentes (ESTUDES, 2016). Además, también se ha observado un mayor consumo en hombres adultos en comparación a las mujeres adultas (EDADES, 2015).

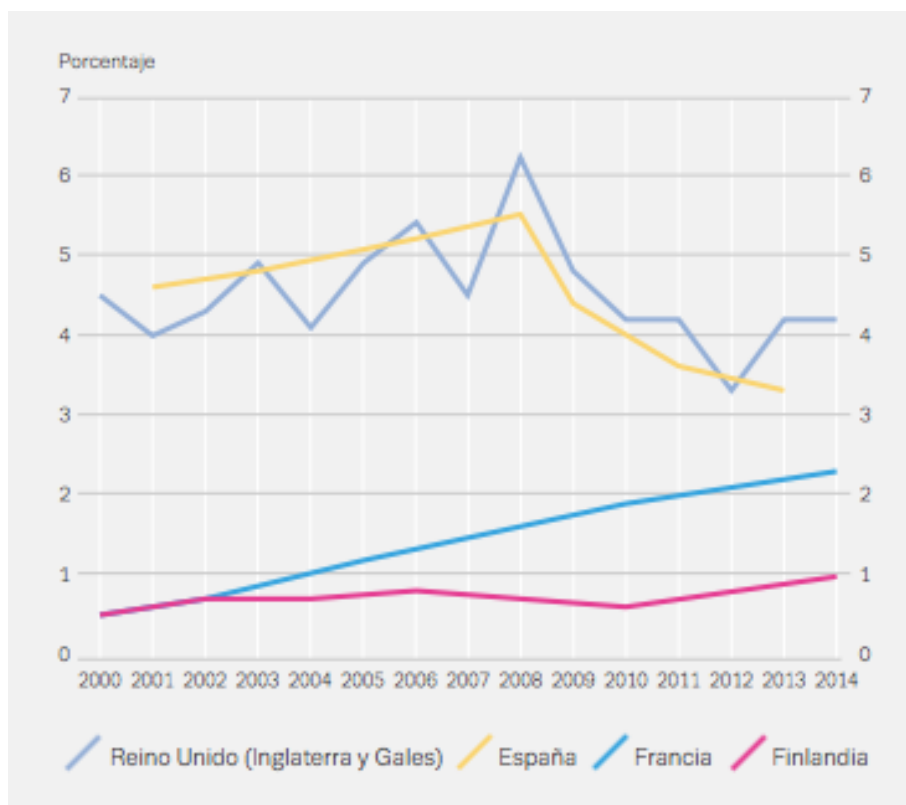
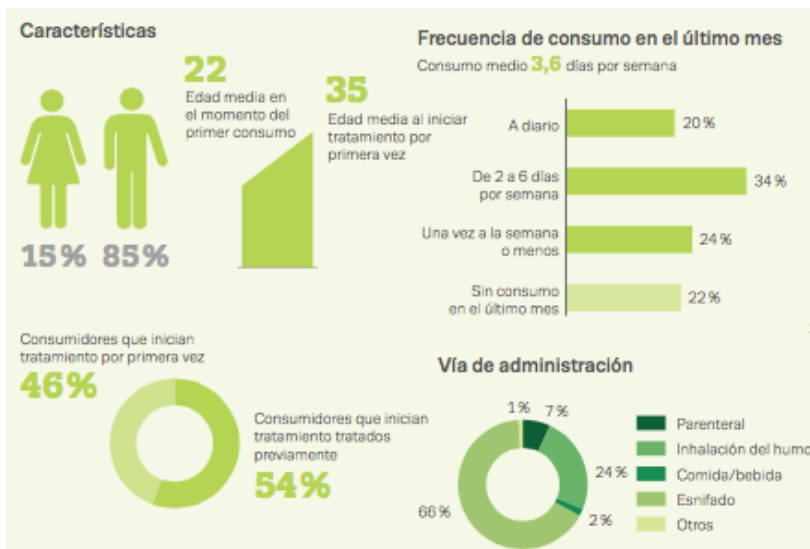


Figura 1. Prevalencia en el último año de consumo de cocaína entre adultos jóvenes (15 a 34 años). Extraído del Informe Europeo sobre Drogas 2016.

En cuanto a la petición de tratamiento por consumo de sustancias de abuso, la cocaína fue citada como droga principal de consumo por el 13% de los sujetos que solicitaron tratamiento especializado (55.000) en 2013 y por el 16 % de los que iniciaron tratamiento por primera vez (25.000). En los últimos informes, se observa una tendencia a la disminución de la demanda de tratamiento por dependencia a la cocaína, pasando de 38.000 personas en 2008 a 25.000 en 2013. Sin embargo, de los consumidores en tratamiento, el 49% son los que lo han solicitado por primera vez, mientras que el 52% son personas que ya han estado en tratamiento, indicando la tasa de recaída en el consumo que se produce en los adictos a la cocaína (ver Figura 2).



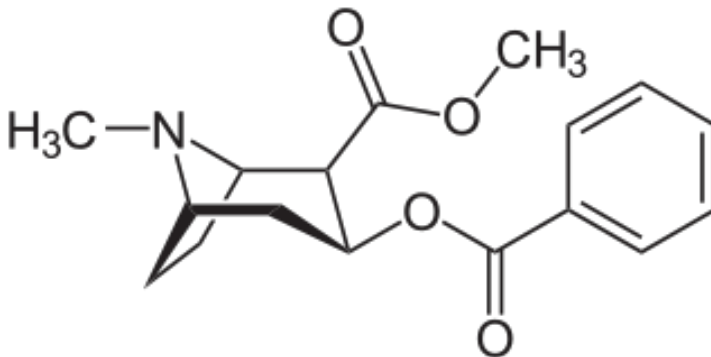
*Figura 2. Datos de los consumidores europeos que inician tratamiento.*

*Extraído del Informe Europeo sobre Drogas 2016.*

## *Cocaína*

### **2.3. Estructura y farmacología**

El clorhidrato de cocaína es la forma farmacéutica utilizada como anestésico local, y como droga de abuso (Figura 3). El alcaloide de la cocaína se extrae de las hojas de la coca, para luego convertirse en clorhidrato de cocaína utilizando ácido clorhídrico (Shanti y Lucas, 2003). El resultante es un polvo blanco cristalino el cual habitualmente se consume por vía intranasal, aunque, al ser fácilmente soluble en agua también puede ser disuelta e inyectada, un método menos común.



*Figura 3. Estructura química de la cocaína.*

Diferentes rutas de consumo producen diferentes patrones y niveles de concentración de cocaína en plasma. Es de rápida absorción cuando se administra mediante inyección intravenosa o fumada (crack). Por lo tanto, las dosis únicas administradas por dichas rutas producen altas concentraciones de cocaína circulante (500-1000 ng/ml) (Carrera y



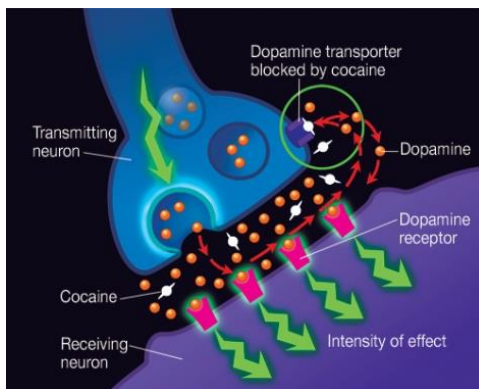
cols., 2004). Esnifada, el resultado se traduce en una absorción más lenta; por consiguiente, estas rutas producen niveles más bajos de cocaína en el intervalo de 100-500 ng/ml, por lo tanto la biodisponibilidad de la cocaína dependerá de la vía de administración.

La cocaína se metaboliza principalmente en el éster metílico de ecgonina y benzoilecgonina, que se excreta a nivel renal. A menor escala también se forman los metabolitos biológicamente activos ecgonina y la norcocaína. Tras la transformación de la cocaína al éster metílico ecgonina, se produce la catalización de las colinesterasas. Por último, la desmetilación de la cocaína para formar norcocaína tiene lugar a través del sistema hepático.

Siguiendo con la farmacocinética de la cocaína, su vida es corta, aproximadamente de 90 minutos (0.7-1.5 horas), ya que se metaboliza rápidamente en el hígado, lo que conduce durante su primer paso a la producción de benzoilecgonina, por lo que la mayoría de la dosis administrada es eliminada en pocas horas. La eliminación renal de la cocaína y benzoilecgonina es rápida. La desintoxicación metabólica de la cocaína es promovida por las colinesterasas plasmáticas y hepáticas, y pueden reflejar variaciones inesperadas en la intensidad de la respuesta farmacológica y toxicológica a la cocaína dependiendo de las condiciones concretas del sujeto (Carrera y cols., 2004).

## ***Cocaína***

En relación a su farmacodinámica, la cocaína ya sea inhalada, fumada o inyectada penetra rápidamente en el torrente sanguíneo, penetra en el cerebro y favorece la transmisión de dopamina (DA) mediante la unión a la proteína transportadora responsable de la recaptación de la DA (DAT) de la hendidura sináptica (Figura 4). La cocaína, al unirse a la DAT inhibe la recaptación de la DA del espacio sináptico, aumentando el tiempo que la DA está disponible en la hendidura sináptica y sobreactivando así la neurona receptora (Nesler, 2005; Kalivas, 2007; Hanlon y cols., 2013).



*Figura 4. Mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína produce su principal efecto inmediato provocando una elevada acumulación de DA. Imagen tomada del National Institute on Drug Abuse (NIDA).*

### **2.3.1. Efectos a corto plazo de la cocaína**

La cocaína produce un aumento de DA en el cerebro en todo lugar donde exista DAT, pero su capacidad de producir placer y euforia, pérdida de control y respuestas compulsivas hacia claves asociadas a la droga se inicia con el primer impacto que produce en el sistema límbico (Hyman y Malenka, 2001; Nestler, 2001; Kalivas y McFarland,

2003). Una parte en concreto del sistema límbico, el Núcleo Accumbens (NAcc), parece ser el núcleo más relevante en cuanto al aumento de DA que produce la cocaína (Nestler, 2005). Cuando el NAcc es estimulado por la DA, se inicia el proceso de refuerzo y recompensa. La función natural de esta respuesta es mantener la atención en actividades que salvaguardan los objetivos biológicos básicos de supervivencia y reproducción.

El aumento artificial de disponibilidad de DA producido por la cocaína, tiene como consecuencia una poderosa sensación de refuerzo “quiero más”. El *shell* (corteza) (zona externa del NAcc) parece ser más importante que el *core* (núcleo) (zona interna del NAcc) en cuanto a la recompensa producida por la cocaína (Rodd-Henricks y cols., 2002; Ikemoto, 2007) ya que el aumento de DA es más fuerte y más inmediato en el *shell* del NAcc (Lecca y cols., 2007; Aragona y cols., 2008). El sistema límbico incluye también importantes centros de memoria, que se encuentran en hipocampo y amígdala. Cuando se experimenta el pico eufórico “*rush*” junto con la activación fisiológica “*high*” de la cocaína, estas regiones imprimen recuerdos intensos del placer y activación experimentada, así como las personas, lugares y cosas relacionadas con la droga.

## ***Cocaína***

### **2.3.2. Efectos a largo plazo de la cocaína**

El efecto agudo de la cocaína va a producir cambios cerebrales duraderos si el consumo es repetido (neuroplasticidad). La cocaína, al elevar de manera continuada los niveles de DA, por encima de lo que se produce con los refuerzos primarios, producirá una forma de aprendizaje patológico que conduce a la adicción pues afecta al sistema de neurotransmisión de la dopamina y a su relación con el resto de sistemas, así como, a estructuras cerebrales.

La corteza frontal, área cerebral donde se integra la información y controla la toma de decisiones, en estado normal actúa como un freno de las otras regiones del sistema límbico, cuando de forma consciente renunciamos a un placer para evitar sus consecuencias negativas. En un consumo continuado de cocaína, la corteza frontal, junto con el resto de estructuras límbicas, va cambiando, produciéndose una comunicación alterada y deteriorada, afectando a la toma de decisiones conscientes y al control de la conducta (Volkow y cols., 2003).

### **2.4. La cocaína y el sistema cerebral de la recompensa**

Los efectos reforzantes de los estímulos primarios, así como de las drogas de abuso como la cocaína, están mediados por la activación del

sistema cerebral de la recompensa. El sistema dopaminérgico mesolímbico, uno de los principales focos de investigación en la neurobiología de los efectos reforzantes positivos de las drogas de abuso, ha sido implicado en los efectos reforzantes de las drogas de abuso (Wise, 1996; McBride y cols., 1999; Pierce y Kumaresan, 2006; Carlezon y Thomas, 2009) y parece fundamental al otorgar valor de recompensa a los estímulos reforzantes relacionados con las conductas operantes (auto-administración) y valor incentivo a los estímulos asociados y condicionados al consumo (efectos condicionados) (Di Chiara, 1995). Este sistema se proyecta desde el área tegmental ventral (ATV) hacia el NAcc, amígdala, hipocampo y córtex prefrontal (CPF) (Kalivas, 2007). El consumo crónico de drogas produce neuroadaptaciones a largo plazo en este circuito cerebral del refuerzo, tanto en su morfología como en su funcionalidad, que explicarían que la búsqueda de esas sustancias y el deseo de consumirlas sean el principal objetivo de la persona y que sigan persistiendo aún transcurrido un largo periodo de tiempo (Koob y Volkow, 2010).

La adicción es una enfermedad crónica y recidivante que se define por dos características principales: una compulsión para tomar la droga y una pérdida de control en la limitación de la ingesta (Koob, 2013). Un objetivo importante para la investigación neurobiológica es comprender las diferencias neuroadaptativas y los procesos

## ***Cocaína***

moleculares que median entre el uso y la pérdida de control en el consumo, los cuales conducen a la adicción (Koob y Le Moal 1997).

La cocaína afecta a la expresión de numerosos genes, incluyendo algunos que influyen en la transmisión del glutamato y en el sistema de opioides endógenos (Nestler, 2001; Kalivas y McFarland, 2003). También afecta a varios factores de transcripción. Sus efectos sobre la expresión de la proteína  $\Delta$ FosB son los de más larga duración. Esta proteína, que actúa como factor de transcripción, se halla presente, de manera natural, en pequeñas cantidades en el interior de la neurona y estimula ciertos genes, pero la exposición crónica a la cocaína provoca que se acumule en altos niveles (Nestler y cols., 2001). Parece ser que la proteína  $\Delta$ FosB puede constituir un disparador molecular importante en la transición del uso esporádico de cocaína al desarrollo de un consumo descontrolado y compulsivo; sin embargo, su vida útil no abarca el tiempo suficiente para explicar por qué los exconsumidores de cocaína continúan experimentando ansia incontrolada por el consumo "*craving*" y presentan múltiples recaídas después de meses y años de abstinencia.

La persistencia de recaídas en el consumo de cocaína indica la presencia de efectos neurobiológicos de muy larga duración (Nestler, 2005) y otros mecanismos además del comentado. Muchos estudios ponen de relieve un cambio observado con el consumo crónico de

cocaína, y que sigue apareciendo tras varios meses de la última exposición a la cocaína: cambios en la estructura física de las neuronas que se encuentran en el NAcc, que mediante la proliferación de nuevas ramificaciones en sus dendritas, aumentan el número de conexiones con otras estructuras como por ejemplo el hipocampo, la amígdala o el CPF (Nestler, 2001; Robinson y Berridge, 2001). Este aumento de la conectividad del NAcc puede derivar en algunos de los cambios conductuales a largo plazo observados en la adicción a la cocaína. Por ejemplo, el aumento de *inputs* al hipocampo o amígdala puede ser responsable de la sensación de *craving* que puede aparecer cuando se activan los estímulos asociados a la droga (Nestler, 2005).

La neuroplasticidad inducida por las drogas en general, y por la cocaína en concreto, tendrá un impacto diferente dependiendo de la vulnerabilidad biopsicosocial de cada individuo y del momento de su vida en el que se produzca.





## 2. Factores de riesgo en la adicción



Al igual que sucede ante otros trastornos, los seres humanos no poseen el mismo riesgo a desarrollar un proceso adictivo. Son muchos y diversos los factores, características y variables que intervienen en el proceso de la adicción. En esta sección se comenta la importancia de algunos de ellos: la adolescencia, momento del desarrollo humano en el que se produce el mayor inicio en el consumo de las sustancias de abuso; el gusto y/o la preferencia por la búsqueda de nuevas sensaciones, característica individual que aumenta en este periodo e interviene en el inicio en el consumo; el patrón de consumo de alcohol conocido como “borrachera o *binge drinking*” que se realiza en este periodo y que es un factor clave que determina, en algunos individuos, la respuesta posterior a esa droga o a otras; así como el diferenciado efecto del consumo de drogas dependiendo del género de pertenencia ya que, al igual que ocurre en otros ámbitos, hombres o mujeres difieren en su respuesta.

### **3.1. Adolescencia y consumo de drogas**

La adolescencia es el período de transición de la niñez a la edad adulta (Spear, 2000). Es un espacio temporal del ciclo vital del individuo en el que se suceden cambios neuroanatómicos y neuroquímicos que modulan la plasticidad del cerebro en desarrollo, afectando a la funcionalidad sináptica y a la conectividad neuronal (Giedd, 2004, 2008; Segalowitz y cols., 2010; Spear, 2013). Los estímulos

### ***Factores de riesgo en la adicción***

ambientales influirán en dichos cambios interactuando con las funciones neurobiológicas del individuo. Actuarán como factores de protección o, por el contrario, predispondrán a la adicción a las drogas, aumentando el riesgo a progresar del uso a la dependencia (Casey y Jones, 2010). Asimismo, la investigación preclínica ha demostrado que los procesos de desarrollo durante la adolescencia se alteran por la exposición a fármacos psicoactivos (Laviola y cols., 1999).

Este momento del desarrollo humano se caracteriza por un aumento de las conductas de exploración, de la búsqueda de sensaciones y gusto por la novedad, lo cual conlleva un aumento de comportamientos de alto riesgo, lo que podría explicar el patrón de inicio de consumo de alcohol, tabaco y el resto de drogas no legales (Chen y Kandel, 1995).

El sistema nervioso central está en desarrollo, y los cambios que experimenta conllevan la maduración y conectividad de estructuras de forma secuencial. Los cambios que se producen incluyen tanto el aumento como la disminución neuronal, son específicos de cada zona, y sirven para filtrar la conectividad funcional cerebral. Los sistemas de control inhibitorio van madurando junto con las circunstancias emocionales del día a día del adolescente, mientras que, la activación del cerebro es elevada en regiones relacionadas con las recompensas relevantes, mientras que la sensibilidad a los estímulos aversivos

## ***Factores de riesgo en la adicción***

parece estar atenuada (Spear, 2013). Es de señalar el desarrollo tardío de la CPF y los circuitos que participan en la toma de decisiones y en el control inhibitorio (Casey y cols., 2000; Segalowitz y cols., 2010), que son considerados la base de la propensión de los adolescentes a la impulsividad y a hacer caso omiso de las consecuencias negativas de su comportamiento, lo cual podría aumentar el riesgo de abuso de sustancias (Casey y Jones, 2010).

A nivel celular se han observado diversos cambios en la maduración del encéfalo. Por un lado, disminuye el volumen de materia gris y las conexiones sinápticas no necesarias, mientras que continúa desarrollándose la mielinización de la sustancia blanca, permitiendo una comunicación más eficiente y oportuna entre distintas regiones del cerebro (Giedd, 2004; Spear, 2013).

Los cambios en la cantidad de materia gris y blanca parecen estar asociados con un exceso de producción de axones y sinapsis en la pubertad temprana y con la poda rápida en la adolescencia tardía (Sowell y cols., 2004). Estos eventos reflejan una reestructuración o refinamiento de la conexión entre neuronas y células gliales (Campos y Stevens-Graham, 2002).

### ***Factores de riesgo en la adicción***

Por tanto, se pueden enumerar tres procesos principales que se ocasionan durante las dos etapas de maduración del cerebro y la transición a la edad adulta (Lenroot y Giedd, 2006):

1) La proliferación, en el que un rápido crecimiento de la materia gris y la formación de nuevas conexiones dentro del cerebro tienen lugar (Giedd y cols., 1999).

2) La poda o maduración de la materia gris. Nuevas conexiones sinápticas son establecidas, mientras que otras son eliminadas para reflejar, en parte, una disminución en el volumen de materia gris (por ejemplo, la CPF) (Huttenlocher y Dabholkar, 1997; Tamnes y cols., 2010). La poda está fuertemente influenciada por la experiencia y esto hace que el cerebro adolescente sea extremadamente versátil y capaz de realizar cambios en función de las exigencias del medio.

3) La mielinización. El aumento de los axones mielinizados acelera la comunicación entre las neuronas y produce conexiones más estables (Perrin y cols., 2009; Sowell y cols., 2001). La progresiva mielinización de los axones conduce a un incremento de la materia blanca cortical sirviendo para acelerar el flujo de información a lo largo de los axones, aumentando así la velocidad de procesamiento de la información en el cerebro (Sowell y cols., 2003).

Entre las regiones del cerebro que muestran cambios ontogénicos marcados durante la adolescencia está la CPF (Crews y cols., 2007; Caballero y cols., 2016). El volumen de CPF se reduce (Sowell y cols.,

2001; Caballero y cols., 2016), y dicha reducción se asocia a un refinamiento en los circuitos neuronales y su conectividad. Se observa una activación de la neurotransmisión de DA y serotonina la cual al llegar a la edad adulta deja de tener cambios visibles, (Caballero y cols., 2016). Estos cambios de remodelación en los circuitos neuronales se asocian con modificaciones funcionales y cognitivas, observándose en la adquisición de funciones ejecutivas, como es la inhibición de respuesta, los procesos de atención, o la memoria de trabajo (Casey y cols., 2000; Paus, 2005). Regiones subcorticales también se someten a una considerable remodelación durante la adolescencia (Toga y Thompson, 2003; Sowell y cols., 2004), en particular la interconexión de la red de circuitos con la CPF, incluyendo la amígdala y otras regiones terminales mesocorticolímbicas dopaminérgicas (Spear, 2013).

Estas características neuronales, aunque transitorias, parecen predisponer a los adolescentes a comportarse de una manera particular, y los hacen especialmente propensos a iniciarse en el uso de alcohol y otras drogas en relación a otras edades (Spear, 2000; Casey y Jones, 2010). Los estudios epidemiológicos informan que de los adultos consumidores de drogas, aquellos que iniciaron el consumo en la adolescencia temprana, tienen mayor probabilidad de desarrollar un trastorno por uso de sustancias de abuso (Hingson y cols., 2006). Aunque la correlación observada en dichos estudios no

### ***Factores de riesgo en la adicción***

implica causación, la importancia del inicio en el consumo de sustancias de abuso a una edad temprana es una variable clave a tener en cuenta en la prevención de la adicción.

Los estudios realizados evidencian que humanos y roedores adolescentes experimentan cambios similares tanto estructurales como funcionales en el cerebro, a medida que avanzan hacia la edad adulta (Schramm-Sapyta 2009). Las conexiones entre la amígdala y la CPF maduran durante esta fase, como se demuestra por estudios de microscopía en roedores (Cunningham y cols., 2002, 2008) y estudios de imágenes por resonancia magnética funcional en los seres humanos (Ernst y cols., 2005; Eshel y cols., 2007).

La investigación preclínica pone de relieve que algunos de los efectos del consumo de sustancias de abuso difieren dependiendo de si los animales son adolescentes o adultos. Los roedores adolescentes son, de manera consistente, menos sensibles a los efectos de la abstinencia y en el balance entre los efectos reforzantes vs. aversivos que producen las drogas se inclinan hacia la recompensa (Arenas y cols., 2016). También difieren de los roedores adultos en la cantidad de DA liberada en respuesta a la administración de anfetamina o cocaína: el cambio del nivel de DA en el entorno extracelular es mayor en adolescentes que en adultos (Badanich y cols., 2006; Walker y Kuhn, 2008) y la tasa de aumento de consumo parece ser más rápida en



adolescentes (Badanich y cols., 2006; Camarini y cols., 2008). En general, los estudios sugieren que los animales adolescentes son más vulnerables a la dependencia/adicción a las drogas que los animales adultos (Schramm-Sapyta y cols., 2009).

### **3.2. Búsqueda de la novedad como factor de vulnerabilidad**

La conducta de búsqueda y de preferencia por la novedad (*novelty seeking*, (NS)) se considera un rasgo de personalidad indicativo de la tendencia hacia la novedad, a las experiencias o emociones fuertes y variadas, y en ocasiones arriesgadas o peligrosas (Zuckerman, 1979; Cloninger, 1987; Zuckerman y Kuhlman, 2000). Esta característica individual ha resultado ser un factor relevante a la hora de predecir el uso de sustancias de abuso, tanto en humanos como en roedores (Wingo y cols., 2015; Arenas y cols., 2016), considerándose, junto con la impulsividad y la ansiedad, un “rasgo de vulnerabilidad” al desarrollo de adicción a las drogas (Belin-Rauscent y cols., 2016).

La búsqueda de la novedad es una conducta adaptativa. Los organismos están biológicamente preparados para atender a la información más novedosa antes que a la información familiar. A nivel sensorial, los sistemas visual, auditivo, olfativo y táctil están diseñados de tal manera que los estímulos pierden su impacto con la presentación constante o repetitiva (habitación). En este proceso de

### ***Factores de riesgo en la adicción***

adaptación sensorial, el sistema nervioso reacciona a los estímulos novedosos, así como a los aumentos en la intensidad de los estímulos familiares. La novedad tiene efecto positivo en el aprendizaje y se relaciona con la capacidad de anticipar los eventos futuros, circunstancia que mejora la adaptación al entorno (Bardo y cols., 1996). La búsqueda de sensaciones y la exposición a drogas de abuso varía en el transcurso de la vida, y tanto en animales como en humanos, ambas se incrementan durante la adolescencia (Laviola y cols., 2003; Bidwell y cols., 2015).

Tanto en la respuesta a la novedad, como en las conductas que se realizan para conseguirla, existen diferencias individuales que informan de las diferencias de adaptación al entorno. El comportamiento de búsqueda de la novedad, considerado como un fenotipo "rasgo", varía en la expresión a través de los individuos dentro de una especie determinada. Los individuos que son altos buscadores de novedad pueden poseer alguna ventaja sobre los bajos buscadores de novedad, como por ejemplo en la localización de nuevas fuentes de alimento o en la localización de fuentes potenciales de peligro. Sin embargo, la búsqueda de la novedad desenfrenada puede ser desfavorable en situaciones donde se requiera la inhibición del comportamiento para la evitación de eventos peligrosos (Cloninger y cols., 1998). La variación observada en la búsqueda de novedad y de sensaciones, se vincula a diferencias individuales en la maduración del

sistema cerebral de la recompensa. Esta maduración, de inicio en la adolescencia, progresa hasta el joven adulto y parece sustentar rasgos del temperamento como la impulsividad y la búsqueda de sensaciones que van decreciendo con la edad (Alcázar y cols., 2015).

Los estímulos novedosos activan el sistema cerebral de la recompensa, ya que provocan la liberación de DA en el NAcc (Schultz, 2011), así como también lo activan otros rasgos de personalidad como la extraversión (Belcher y cols., 2014). La liberación de DA en el NAcc es la señal característica del refuerzo, es decir, hace que la conducta se repita con mayor probabilidad. La activación de este sistema es también la diana inicial a través de la cual las drogas ejercen su efecto reforzante (Berridge y Robinson, 1998).

La actividad del sistema dopaminérgico en el estriado parece ser clave, donde la combinación de un elevado tono dopaminérgico junto con una menor densidad de receptores D2 de DA, modifica las reacciones de acercamiento o evitación ante estímulos de intensidad similar, observándose en la conducta mayor o menor índice de búsqueda de NS; los autores señalan este mecanismo a la base de la aparición de trastornos del control de impulsos, como es la adicción a las drogas y también al juego patológico (Norbury y Husain, 2015). En este sentido, Bardo y colaboradores (2013) plantean que las diferencias individuales y la variación aparente, en el consumo de drogas, puede ser debida a

### ***Factores de riesgo en la adicción***

diferencias individuales en respuesta al refuerzo, según la búsqueda de novedad sea alta o baja. En humanos consumidores de anfetamina se produce mayor liberación de DA en el NAcc en aquellos señalados como altos buscadores de novedad (Leyton y cols., 2002).

Así mismo, estudios preclínicos muestran que todo el circuito del sistema cerebral de la recompensa presenta diferencias ante la administración de drogas en función del nivel de NS que muestran (Bardo y cols., 2013). Los modelos animales utilizan la categorización de los animales como altos- o bajos-NS (altos/bajos-*NoveltySeekers*, Buscadores de la Novedad) de acuerdo al nivel de actividad que realizan ante la novedad (Dellu y cols., 1996; Blanchard y cols., 2009). Utilizando el modelo de los altos/bajos-NS, se ha demostrado la relación entre la actividad locomotora inducida por la búsqueda de la novedad, la exploración de lo novedoso, el consumo de drogas y otras conductas de riesgo (Piazza y cols., 1989; Hooks y cols., 1991; Dellu y cols., 1996; Kabbaj, 2006; Davis y cols., 2008).

La búsqueda de la novedad en roedores se puede definir como el aumento específico de la exploración y la actividad ante nuevas situaciones, objetos o estímulos desconocidos (Arenas y cols., 2016). Los trabajos realizados con animales han utilizado dos aproximaciones metodológicas distintas que no son necesariamente paralelas.

Una de ellas es el estudio de la reactividad motora en un ambiente nuevo, en el que el animal no tiene escapatoria, durante un determinado período de tiempo (Piazza y cols., 1989; Deltu y cols., 1996). Otra estrategia es la de estudiar la preferencia del animal por situaciones u objetos nuevos vs. conocidos mediante un procedimiento de libre elección del animal (Bardo y cols., 1996; Arenas y cols., 2016). Ambas aproximaciones parece que pueden estar evaluando aspectos diferentes de la conducta de los animales; Mitchell y colaboradores (2005) observan que la actividad locomotora de las ratas no es, por sí misma, predictor de la auto-administración de cocaína, siendo más bien, las diferencias de los animales en la respuesta a la novedad y el aprendizaje.

El desarrollo de protocolos y variantes adecuados, como por ejemplo la prueba del *hole-board* (no hay elección de objeto o lugar sino de exploración, y la medida no es de locomoción), ha permitido enfrentar la complejidad de algunos aspectos de la adicción. De este modo se ha podido observar que la reactividad locomotora inducida por la novedad es buen predictor de la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína cuando los ratones son adultos jóvenes (a los 56 PND, *post natal days*), mientras que la prueba del *hole-board* es la adecuada en ratones adolescentes (35 días) (Arenas y cols., 2014). Igualmente, se ha propuesto como una medida útil con la que examinar la relación

### ***Factores de riesgo en la adicción***

entre la búsqueda de novedad y el abuso de drogas (Kliethermes y cols., 2007).

En la actividad locomotora, Piazza y colaboradores (1989) demuestran que la administración de una dosis aguda de anfetamina, produce mayor hiperactividad en altos-NS que en bajos-NS. Este resultado no es aislado; en diversos estudios los animales altos-NS muestran mayor sensibilidad a los efectos estimulantes motores de la anfetamina (Hooks y cols., 1991; 1992b), y a la cocaína (Hooks y cols., 1991, 1992a; Gong y cols., 1996; Kosten y Miserendino, 1998; Chefer y cols., 2003; Sell y cols., 2005).

En cuanto a los efectos gratificantes de los psicoestimulantes, son las ratas clasificadas como altas-NS, las que se auto-administran cocaína o anfetamina con mayor facilidad (Piazza y cols., 1989; Hooks y cols., 1991; Klebaur y cols., 2001). También puntúan más en los indicadores relacionadas con la adicción, como es consumo compulsivo (aumento punto de corte), resistencia al castigo y persistencia en la conducta de conseguir cocaína aunque no se encuentre disponible (Belin y cols., 2011). El paradigma de condicionamiento de la preferencia a un lugar (CPL) ha corroborado estos hallazgos. Las ratas altas-NS muestran preferencia condicionada inducida con anfetamina (Klebaur y Bardo, 1999) al igual que los ratones altos-NS son más sensibles al refuerzo condicionado inducido con cocaína (Arenas y cols., 2014).

Además, los animales altos-NS, respecto a los bajos-NS, muestran mayores reacciones fisiológicas de abstinencia tras la retirada de un tratamiento crónico con morfina (Cecchi y cols., 2007), aspecto relacionado con la mayor probabilidad de desarrollar conducta adictiva mostrada por los altos-NS, puesto que el estado aversivo asociado a la abstinencia puede inducir recaída en el consumo (Nadal, 2008).

Las pruebas conductuales están reflejando los resultados obtenidos en estudios con microdiálisis *in vivo* que señalan diferencias en la actividad funcional del sistema dopaminérgico mesolímbico entre altos- y bajos-NS. Bradberry y cols., (1991), evaluaron a ratas en su reacción a la novedad utilizando el test del *hole-Board* y el test del objeto novedoso, y posteriormente se les midió la liberación de DA en el NAcc después de la administración de amfetamina. Los análisis correlacionales revelaron que había una relación directa entre la cantidad de conducta exploratoria y la liberación de DA en el NAcc estimulada por la amfetamina. Otros estudios han demostrado que ratas altas-NS también muestran una mayor liberación de DA en el NAcc ante la administración de cocaína (Hooks y cols., 1992a) y una menor recaptación de dopamina en el NAcc (Chefer y cols., 2003) en comparación con las ratas bajas-NS. Puesto que la principal acción farmacológica de la cocaína es inhibir la recaptación de DA, la cocaína

### ***Factores de riesgo en la adicción***

parece tener más efecto neuroquímico en los animales altos-NS que en los animales bajos-NS (Bardo y cols., 1996). En resumen, los roedores altos-NS presentan mayor riesgo en sus comportamientos y muestran mayores alteraciones conductuales y neuroquímicas en respuesta a factores ambientales estresantes o/y ante tratamientos farmacológicos (Bevins y cols., 1997; Klebaur y cols., 2001).

Además, la investigación con modelos animales está demostrando que el rasgo de NS es un buen predictor de la sensibilidad al efecto reforzante condicionado de las drogas en las primeras etapas de la adolescencia, por lo que pasa a ser significativa su evaluación a la hora de planificar programas de prevención del consumo de drogas. Es en los ratones adolescentes categorizados como altos-NS, donde una dosis sub-umbral de cocaína produce preferencia condicionada por el lugar donde fue administrada, dosis que no detectan los adolescentes bajos-NS o los ratones adultos (Vidal-Infer y cols., 2012). Similar resultado se ha obtenido utilizando un agonista cannabinoide, con el que desarrollaron una preferencia condicionada los adolescentes altos-NS, además, el tratamiento previo con el cannabinoide produjo que todos los ratones altos y bajos NS desarrollaran una preferencia por esa dosis sub-umbral de cocaína, pero, solo los altos-NS presentaron reinstauración de la preferencia ante dosis *priming* de cocaína, efecto que no es usual observar y que indica mayor vulnerabilidad de esos ratones con el consumo previo (Rodríguez-Arias



y cols., 2016). Los ratones altos-NS en la adolescencia, con consumo temprano de MDMA o etanol son más sensibles en la edad adulta ante el contacto con la cocaína (Montagud-Romero y cols., 2014; Rodríguez-Arias y cols., 2015).

### **3.3. Consumo previo de drogas en el desarrollo de la adicción**

El consumo recreativo o experimental puede ser el punto de partida a una adicción, pero no necesariamente sucede de esa manera; gran parte de la población general está expuesta a las drogas de abuso, pero solo una pequeña fracción desarrolla un trastorno por uso de sustancias (Reboussin y Anthony 2006; Belin-Rauscent y Belin, 2012; Belcher y cols., 2014). Son múltiples los factores implicados en el desarrollo de la adicción que, interactuando entre ellos, apresan al individuo en un “ciclo de consumo, abstinencia y recaída” (Koob y Le Moal, 1997), pero es la sustancia de abuso ingerida la que induce las neuroadaptaciones necesarias en la transición a la adicción. Y el consumo de la droga en ocasiones posteriores, produce neuroadaptaciones sobre lo ya existente.

El consumo de una droga modifica el cerebro y modifica la respuesta que se realiza ante el consumo posterior de cualquier droga. Esta idea refleja el concepto de “*gateway*” o “puerta de entrada” en referencia a que el consumo de marihuana, considerada “droga blanda”, podía

### ***Factores de riesgo en la adicción***

ser el lazarillo que llevaba al consumo de otras drogas consideradas “duras”, como cocaína y heroína.

Aunque no hay una relación causa-efecto, se ha comprobado repetidamente que el inicio en el consumo de cocaína y de heroína está precedido por consumo de marihuana (Agrawal y cols., 2004; Lessem y cols, 2006; Secades-Villa y cols., 2015). Pronto se ha aplicado el concepto de *gateway* al consumo de tabaco y/o alcohol, sustancias de fácil acceso, apoyado por los informes provenientes de estudios epidemiológicos (Grant y cols., 2001; 2006); los adultos adictos a la cocaína presentan un consumo de alcohol más temprano que los no adictos (15.5 años frente a 18.1 años) (Arias y cols., 2013), al igual que los adictos al alcohol (Spear, 2015). El orden de consumo de estas drogas es muy dependiente de las influencias sociales en cada región (Mayet y cols., 2016) y en la actualidad, es el alcohol, consumido al inicio de la adolescencia, la droga a través de la que se transita al consumo de tabaco, cannabis y otras drogas ilegales (Kirby y Barry, 2012), indicando la importancia de priorizar la prevención del consumo de alcohol en la adolescencia frente al resto de drogas (Barry y cols., 2016).

La vulnerabilidad que induce el consumo previo de una droga está bien demostrada con modelos animales (Gulley y Juraska, 2013). El pretratamiento con etanol, agonistas cannabinoides, MDMA o cocaína

altera el efecto reforzante de la misma droga de pretratamiento o de cualquier otra, tanto al realizarse en animales adolescente o adultos. El efecto del pretratamiento es a largo plazo, es decir, la administración de cocaína, agonista cannabinoide, etanol o MDMA en la adolescencia aumenta la respuesta a estas drogas también cuando el animal es adulto (Manzanedo y cols. 2005, 2012; Do Couto y cols., 2011; Hutchison y Riley, 2012; Molet y cols., 2013; Montagud-Romero y cols., 2014; Rodríguez-Arias y cols., 2015; Rodríguez-Arias y cols., 2016).

Dos cuestiones relevantes son a) el policonsumo que realizan los adolescentes y b) el patrón de consumo en forma de “atracción, borrachera o *binge-drinking*”:

a) El inicio con una droga y la transición a otras no implica que se abandone una por otra; con la variada gama de sustancias de abuso, el adolescente prueba y experimenta, algunos van alternando unas con otras, o las consumen al mismo tiempo (Rodríguez-Arias y Aguilar, 2012). El alcohol es la droga de consumo más popular en toda la población, incluida la adolescencia. En el rango de edad 14-18 años, se observa una tendencia a la baja en el consumo de algunas sustancias como alcohol, tabaco o se mantiene estable como ocurre con la cocaína, aún con esto, el consumo sigue siendo relevante (Figura 5). Los datos que ofrece España son similares a los ofrecidos por otros países, (ESTUDES, 2016; Johnston y cols., 2008).

## Factores de riesgo en la adicción

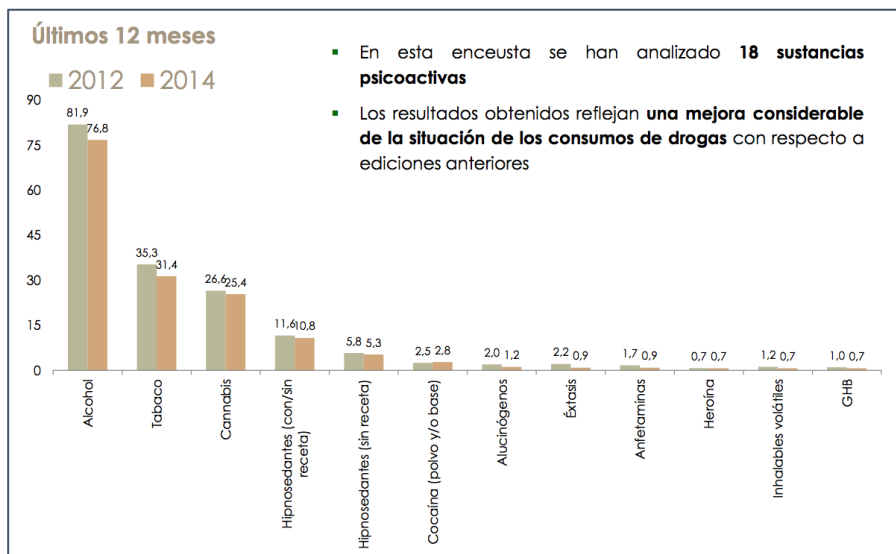


Figura 5. Proporción de adolescentes que han consumido drogas durante los últimos 12 meses en España. Gráfico extraído de ESTUDES (2016) Encuesta sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias en España.

Junto con alcohol, tabaco, cannabis, otras sustancias presentan un consumo puntual, como son las drogas de síntesis. El uso de “éxtasis” (MDMA) es habitual en jóvenes y adolescentes durante los fines de semana, por lo que su consumo se considera esporádico y recreacional (Solowij y cols., 1992). Se toma en pastillas, lo que facilita una ingesta “con mínima parafernalia”.

El contenido de MDMA de cada pastilla es muy variable y suelen contener una amplia gama de sustancias similares a la MDMA y otros productos químicos. Tras un periodo en el que los informes indicaban

que la mayoría de las pastillas vendidas como “éxtasis” en Europa tenían dosis bajas de MDMA o no la contenían en absoluto, se está observando un aumento de la disponibilidad de pastillas con alto contenido de MDMA y de MDMA en polvo y forma cristalina (EMCDDA, 2016). El consumo agudo puede provocar hipertermia, aumento de la frecuencia cardíaca y fallo multiorgánico (De la Torre y cols., 2004). Además, el consumo de éxtasis rara vez se notifica como motivo para iniciar un tratamiento de drogodependencia, siendo responsable de menos del 1 % de los casos notificados de inicio de tratamiento en 2015 (EMCDDA, 2016).

b) El patrón de consumo “atracción, borrachera o *binge-drinking*” de alcohol (consumo excesivo, en un corto espacio de tiempo) agrava la problemática derivada de la ingesta de alcohol (Johnston y cols., 2008). Este patrón de consumo, se inicia en la adolescencia temprana o tardía y va aumentando con la edad gradualmente (Johnston y cols., 2008; Hibell y cols., 2011; Degenhardt y cols., 2013). Se realiza en mayor medida durante el fin de semana, se asocia a un mayor consumo de otras drogas, por lo que está considerado consumo de alto riesgo (ESTUDES 2016).

Los adolescentes con antecedentes de consumo de alcohol se diferencian de los no consumidores a nivel cognitivo y neural. Se ha descrito en ellos presencia de déficit de atención, pérdida de memoria,

### ***Factores de riesgo en la adicción***

dificultad visoespacial, empobrecimiento de las funciones ejecutivas, peor rendimiento académico (López-Frías y cols., 2001; Brown y Tapert, 2004; Nagel y cols., 2005; Zeigler y cols., 2005; Medina y cols., 2008). Además, presentan diferentes patrones de activación cerebral durante la realización de tareas cognitivas (Spear, 2015). Estudios longitudinales, que comenzaron antes de iniciar el uso de alcohol, están empezando a identificar qué características neurocognitivas son anteriores al consumo de alcohol y qué alteraciones parecen ser consecuencia de que el uso (Jacobus y Tapert, 2013).

Las estructuras cerebrales más vulnerables parecen ser la corteza cerebral, el sistema límbico y el cerebelo (Crews y cols., 2005). Se han descrito correlaciones negativas entre el volumen de materia gris en la CPF y el consumo de alcohol, (menor volumen frente a los controles) (De Bellis y cols., 2005). También un menor volumen de hipocampo a nivel bilateral que correlaciona positivamente con la edad de inicio (a más temprano inicio de consumo, más pequeño) y negativamente con la duración del trastorno por consumo de alcohol (a más corta duración, mayor volumen hipocampal) (De Bellis y cols., 2000).

Estudios preclínicos han demostrado la vulnerabilidad del sistema nervioso central a los efectos del etanol y confirmado los efectos neurotóxicos del etanol (Crews y cols., 2000; Pascual y cols., 2007).

Por un lado, la inmadurez neuroquímica del sistema mesocorticolímbico podría contribuir a la iniciación de la ingesta de alcohol; junto con esto, las alteraciones del desarrollo cerebral debidas a la exposición a sustancias de abuso durante la adolescencia, se van acumulando, y se produce un desarrollo cerebral “alterado” por el alcohol. La exposición al etanol durante etapas de desarrollo del cerebro obstaculiza la neurogénesis que se produce durante la adolescencia: en el hipocampo interfiere en la proliferación de células madre neuronales (Morris y cols., 2010), y en la corteza, en la generación de células corticales (Nixon y Crews, 2002; Crews y cols., 2006; Helfer y cols., 2009; Hansson y cols., 2010; Koss y cols., 2012).

Los cambios estructurales discurren con cambios funcionales: aumento de la liberación de DA en áreas como el NAcc (Pascual y cols., 2009, Philpot y cols., 2009), así como con alteración de la sensibilidad a la transmisión GABAérgica en animales con exposición posnatal (Li y cols., 2003; Fleming y cols., 2012).

Estas alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales durante la maduración neurológica cerebral pueden estar provocando cambios permanentes e irreversibles implicados la aparición de patología dual, trastorno mental y adicción (Paus y cols., 2008), o de drogas, en la edad adulta (Hingson y cols., 2006; Spear y Swartzwelder, 2014).

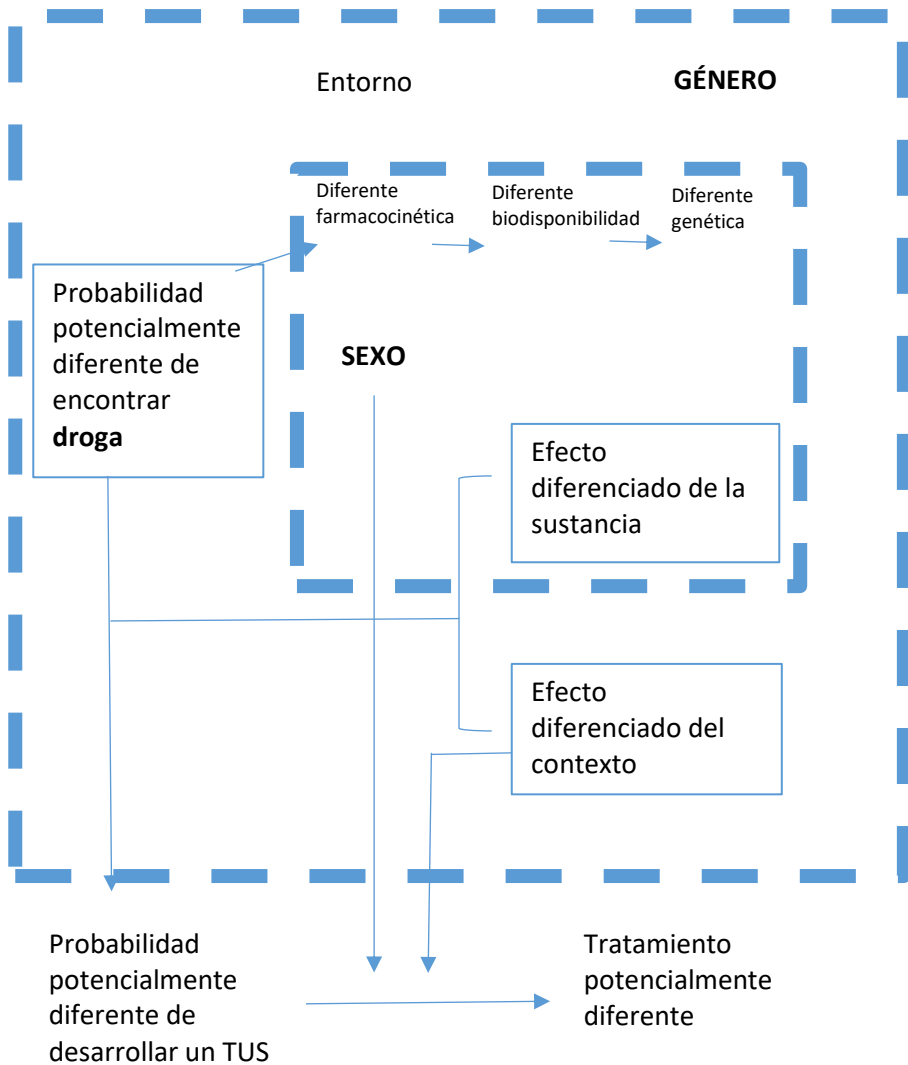
### **3.4. Diferencias de sexo en la adicción a las drogas**

La evidencia obtenida desde la investigación clínica y preclínica indica que el sexo y género de pertenencia podrían ser moduladores del consumo de drogas, así como de la transición hacia el desarrollo de un trastorno por uso de sustancias (Sanchis-Segura y Becker, 2016).

Las diferencias de género influirán en la probabilidad de encontrar drogas en el entorno de cada individuo, así como en los diferentes contextos externos. Una vez la droga ha sido consumida, el sexo de pertenencia será el que influya en la absorción, distribución y metabolización de la sustancia (ver Figura 6).

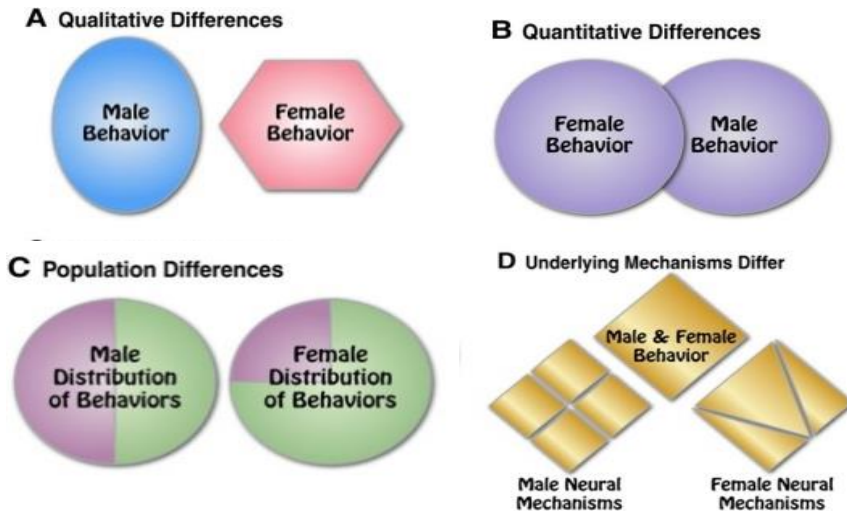
A lo largo de los años, se han refinado los estudios con animales, lo que ha ayudado a categorizar, de manera más precisa y útil, las diferencias de sexo: por ejemplo, Becker y Koob, (2016) señalan que las diferencias de sexo se pueden agrupar en cuatro categorías: cualitativa, cuantitativa, población y mecanismos neurobiológicos (Figura 7). La conducta que presentan machos o hembras en determinadas áreas, p.e. la conducta sexual, puede ser tan diferente que se incluiría en “diferencias cualitativas”. Las “diferencias cuantitativas” estarían referidas a la magnitud de la respuesta de machos o hembras. Las “diferencias de población” harían referencia a la incidencia de la distribución de los rasgos individuales y aunque la





*Figura 6. Influencia del entorno según género y diferencias de efecto en el organismo una vez se ha consumido, según sexo. Adaptado de Sanchis-Segura y Becker, 2016.*

## ***Factores de riesgo en la adicción***



*Figura 7. Categorías observadas en las diferencias de sexo. Extraído de Becker y Koob, 2016.*

expresión de un rasgo sea similar en machos que en hembras, hay diferencias de sexo en los mecanismos neuronales que median esa conducta.

Aplicada esta estructura en el área de la adicción a las drogas, los autores señalan que: los hombres como población presentan susceptibilidad al alcoholismo, mientras que son las mujeres las que progresan con mayor rapidez, por lo que su cualidad es de mayor vulnerabilidad.

Y esto es lo que se observa en la realidad: hombres y mujeres, difieren en prevalencia y frecuencia de sufrir una drogadicción (Fattore y Melis,

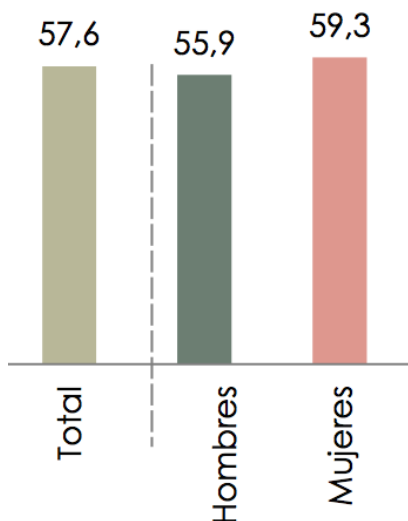
2016). Las mujeres, una vez se han iniciado el consumo, presentan un mayor ritmo de escalada en el consumo, una mayor sensibilidad a los efectos nocivos de las drogas (Lynch y cols., 2002; Becker y Hu 2008; Anker y Carroll 2011), y una vez que han desarrollado una adicción, pueden encontrar más dificultades para superarla (Lewis y cols., 2014), observándose la existencia de diferencias entre hombres y mujeres en todas las fases de la adicción a las drogas (Becker y Hu, 2008; Bobzean y cols., 2014).

Aunque en la población en general existe un mayor número de hombres consumidores de drogas, los últimos datos informan de una tendencia al cambio en algunas sustancias. Este es el ejemplo del consumo intensivo de alcohol durante la adolescencia en España y otros países (Jacobs y cols., 2016; ESTUDES, 2016), el cual se encuentra levemente más extendido entre las mujeres (Figura 8).

Hallazgos en estudios realizados con seres humanos, apoyados por modelos animales, muestran que las hormonas ováricas, el estrógeno y la progesterona, están influyendo en las diferencias de sexo en las diversas fases de la drogadicción (Bobzean y cols., 2014). Dichas hormonas poseen efectos opuestos en cuanto a la búsqueda de la droga se refiere: los estrógenos la facilitan, mientras que la progesterona, y su metabolito la alopregnalona, reducen las

### **Factores de riesgo en la adicción**

conductas relacionadas con el abuso de sustancias (Carroll y cols., 2004; Roth y cols., 2004; Becker y Hu, 2008; Fattore y cols., 2009).



*Figura 8. Porcentaje de jóvenes adolescentes de entre 14-18 que realizan la práctica de botellón en los últimos 12 meses. Gráfico extraído del informe ESTUDES 2016.*

A pesar de ello, cabe decir que estudios recientes han sugerido que los efectos de la progesterona y su metabolito no son específicos, sino que se producen a través de su acción ansiolítica (Anker y cols., 2009).

Por el contrario, estudios que han evaluado el efecto de la testosterona, hormona masculina, no han obtenido resultados concluyentes (Kavintharaj y Vijayammal, 1999; Caine y cols., 2004), si bien es cierto que un estudio con animales sí que ha señalado un papel de la testosterona, siendo necesaria para que se produzca sensibilización a la cocaína (Menéndez-Delmestre y Segarra, 2011).

La investigación clínica permite tener en cuenta factores clave, relacionados con el género y el entorno social (p.e. factores sociológicos y económicos), mientras que la investigación preclínica permite estudiar los factores biológicos que influyen en la adicción y sus hallazgos podrán ser contrastados en estudios clínicos (Carroll y Lynch, 2016). Los modelos en animales para el estudio de la adicción apoyan los resultados obtenidos en humanos: ratas hembras adquieren la conducta de autoadministración de cocaína más rápidamente y son más sensibles a los efectos reforzantes que los machos (Carroll y cols., 2002; Hu y cols., 2004; Lynch, 2006; Kerstetter y cols., 2008). En este paradigma, también presentan una mayor escalada en el consumo, e incrementan la conducta de búsqueda de la droga (Roth y Carroll, 2004; Fattore y cols., 2009, 2010; Reichel y cols., 2012). En cuanto al modelo de CPL, las ratas hembras se condicionan con un menor número de sesiones y con dosis más bajas de cocaína que los machos (Zakharova y cols., 2009; Carroll y Anker, 2010).

Es importante destacar la influencia de neurotransmisores como DA y el GABA los cuales están implicados en la modulación hormonal del estrés y la ansiedad (Carroll y Anker, 2010). La DA está mediando en la respuesta al estrés (Koob, 2009), además de intervenir en los efectos reforzantes asociados con las drogas (Koob and Kreek, 2007), mientras que la neurotransmisión GABAérgica, está afectada por la

### ***Factores de riesgo en la adicción***

progesterona y su metabolito que actúan como potentes moduladores positivos de los receptores GABA A (Lambert y cols., 1995), lo que puede explicar los efectos atenuantes de la progesterona y la alopregnalonona en la conducta de búsqueda de la droga.

A pesar de todas las evidencias que apuntan hacia las diferencias de sexo, no siempre se emplean machos y hembras en los estudios con animales. La mayoría de los estudios preclínicos se han llevado a cabo con machos (Beery y Zucker, 2011), por lo que las conclusiones de los mismos no deberían aplicarse directamente a las hembras. Una posible explicación a la falta de representación que han tenido las hembras en la investigación podría ser la variabilidad que presenta su ciclo hormonal y el esfuerzo por controlarlo. Sin embargo, la revisión que presentan Prendergast y colaboradores (2014), muestra que las hembras no son más variables que los machos y concluyen que no es necesario monitorizar el ciclo estral para obtener resultados óptimos.

Por lo tanto, debido a la cada vez más probada realidad de las diferencias de sexo en trastornos como la adicción, se está produciendo un aumento en el interés por el estudio de las diferencias de sexo, y la realización de investigaciones que contemplen ambos sexos será más completa, aportando nueva información (Arnold, 2014; Zhou y cols., 2015).

## 4. Tratamiento farmacológico de la adicción a la cocaína





Actualmente, no existe ningún fármaco aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU) para el tratamiento de los trastornos por uso de cocaína (Kim y Lawrence, 2014) a pesar de que, como hemos comentado en apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral, solo en Europa, existen cuatro millones de consumidores (United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC 2016), siendo España el segundo país en consumo de esta sustancia (EMCDDA, 2016). La intervención a nivel psicosocial siguen siendo el abordaje más extendido en la dependencia a la cocaína y, ante la ausencia de un tratamiento farmacológico de referencia, se propone el uso de la combinación de ambas aproximaciones con el objetivo de hallar mejores resultados (Dakwar y Nunes, 2016). Dada esta ausencia de tratamiento farmacológico específico se han comenzado a estudiar diversos fármacos que han presentado resultados favorables ante otras drogas (Kalivas y Volkow, 2011; Minozzi y cols., 2015; Shorter y cols., 2015).

Kim y Lawrence (2014) presentan en su revisión las diferencias neuroquímicas existentes entre sujetos dependientes a la cocaína y controles sanos. Según dicha revisión, los adictos a la cocaína muestran desajustes en varios sistemas de neurotransmisión: dopaminérgico (menor disponibilidad del receptor D2 y aumento del transportador de la DA (DAT)); serotoninérgico (mayor serotonina a nivel extracelular y menor disponibilidad del receptor 5-HT1B); glutamatérgico (menores niveles de glutamato); GABAérgico

### ***Tratamiento farmacológico***

(menores niveles de GABA). Por lo tanto, y según los cambios neuroquímicos observados entre cocainómanos y controles, se han utilizado fármacos que actúan en los sistemas afectados arriba mencionados.

A nivel dopaminérgico, la levodopa (L-dopa), administrada junto a la carbidopa, agentes empleados en el tratamiento del Parkinson, podrían tener potencial en el tratamiento de la dependencia a la cocaína (Shorter y cols., 2015). Una vez que la L-dopa ha atravesado la barrera hematoencefálica es convertida a DA. Esto produce un aumento de la cantidad de DA disponible a nivel encefálico, compensando así el estado hipodopaminérgico que produce el consumo crónico de cocaína. Utilizando la L-dopa, se ha observado una reducción de las conductas involucradas en el consumo de cocaína o un incremento del número de tests de orina negativos (Schmitz y cols., 2010); por el contrario, otro estudio señala que no produce reducción del *craving* o del uso de cocaína al compararla con placebo (Mooney y cols., 2007). La dextroanfetamina, otro agente dopaminérgico, es un derivado de la anfetamina que también ha sido objeto de estudio dada su habilidad para corregir la hipodopaminérgia (Castells y cols., 2010). Administrado a dosis altas en pacientes dependientes a la cocaína, se ha observado un aumento de la proporción de análisis de orina negativos, en comparación al placebo (Grabowski y cols., 2001), así como una disminución del consumo (Grabowski y cols., 2004). Sin

embargo, los resultados de otros estudios no obtienen diferencias estadísticamente significativas al final del tratamiento, entre los consumidores de cocaína tratados con dextroanfetamina frente al placebo (Shearer y cols., 2003).

Un fármaco prometedor es el Nopicastat (SYN 117), que actúa como inhibidor de la dopamina beta-hidroxilasa, enzima que cataliza la conversión de DA a noradrenalina. Presenta un perfil relacionado con el Disulfiram, el cual no ha resultado idóneo para el tratamiento de la adicción a la cocaína, posiblemente debido a que afecta a múltiples sistemas (Weinshenker, 2010). Los resultados preclínicos con el nopicastat no son concluyentes; en roedores atenúa la reinstauración de la conducta de búsqueda de la droga (Schroeder y cols., 2013), e incluso la autoadministración de reforzadores naturales como el chocolate (Zaru y cols., 2013), mientras que con primates no se ha observado ese efecto (Cooper y cols., 2014). En humanos, se ha informado que atenúa los efectos subjetivos positivos de la cocaína (De la Garza y cols., 2015).

A nivel serotoninérgico, los fármacos estudiados no parecen, en general, tener una efectividad clínica evidente. La buspirona, agonista parcial de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y aprobada por la FDA para el tratamiento del trastorno de ansiedad generalizada, ha sido probada en un estudio clínico sin mucho éxito a la hora de reducir el *craving*, ni

### ***Tratamiento farmacológico***

el número de análisis de orina positivos (Moeller y col., 2001), aunque en un estudio en roedores ha probado ser efectiva a la hora de reducir la recaída por claves ambientales (Shelton y cols., 2013). El ondansetron, un antagonista del receptor 5-HT<sub>3</sub> aprobado por la FDA para el tratamiento de las náuseas, tampoco ha tenido grandes resultados en dependientes a la cocaína (Johnson y cols., 2006). Por ello, Kim y Lawrence (2014) indican la necesidad de realizar más estudios preclínicos que estudien a fondo la efectividad de fármacos que modulan la función serotoninérgica antes de llevar a cabo los estudios clínicos.

También se están probando fármacos que involucran al sistema GABAérgico, como por ejemplo el vigabatrin, inhibidor irreversible de la aminotransferasa GABAérgica, lo cual incrementa los niveles sinápticos del GABA (Kalivas, 2007). En estudios con humanos ha provocado una mayor abstinencia y una mayor retención al tratamiento (Fechtner y cols., 2006; Brodie y cols., 2009), sin embargo, otros trabajos no han encontrado resultados significativos (Berezina y cols., 2012; Somoza y cols. 2013).

Finalmente, otro agente modulador del sistema GABAérgico que se está estudiando para el tratamiento de la dependencia a la cocaína es el topiramato (TPM). Se considera que sustancias que pueden reestablecer el balance GABA/glutamato podrían reducir el consumo

## ***Tratamiento farmacológico***

de cocaína (Dakwar y Nunes, 2016), por lo que el TPM, modulador de los sistemas de transmisión excitatorio e inhibitorio, puede ser un buen candidato al tratamiento de la cocaína (Thomas y cols., 2008), ya que la modulación del sistema glutamatérgico parece ser prometedora en el tratamiento de los trastornos por uso de sustancias (Dakwar y Nunes, 2016).

El TPM, monosacárido derivado de la fructosa, es una medicación oral aprobada por la FDA para tratar la epilepsia (Chong y Lerman, 2016), así como apoyo al tratamiento de trastornos como el trastorno bipolar (Pichler y cols., 2015), el trastorno de estrés postraumático (Wang y cols., 2014), la bulimia nerviosa (McElroy y cols., 2012), el trastorno por atracón (Berkman y cols., 2015) y el tratamiento de las migrañas (Roceanu y cols., 2014).

El TPM presenta un amplio mecanismo de acción, parte del cual influye en diversos sistemas y procesos relacionados con la adicción (Shinn y Greenfield, 2010). Principalmente, provoca la potenciación del receptor GABA-A (Latini, 2008), así como la inhibición de la transmisión glutamatérgica en los receptores glutamatérgicos AMPA y kainato (Gibbs y cols., 2000; Gryder y Rogawski, 2003). Estas acciones moduladoras en los sistemas GABAérgico y glutamatérgico, relacionadas con el control de la excitabilidad neuronal (Siniscalchi y cols., 2015), pueden disminuir la liberación de DA en el circuito

## ***Tratamiento farmacológico***

mesolímbico-mesocortical (Shinn y Greenfield, 2010). Dicha capacidad de atenuar la liberación de la DA a nivel mesencefálico podría reducir el poder reforzante de las drogas de abuso y, dado que el TPM no es un agente con propiedades adictivas, puede ser una buena alternativa (Siniscalchi y cols., 2015).

Varios estudios clínicos han evaluado el uso del TPM para el tratamiento de la dependencia a sustancias de abuso (Tabla 1). Parece haber consenso en los resultados positivos del TPM ante el tratamiento de la dependencia al alcohol (Flórez y cols., 2008). El tratamiento con TPM reduce el consumo de alcohol (Johnson y cols., 2003; Johnson y cols., 2007; Miranda y cols., 2008; Batki y cols., 2014; Knapp y cols., 2014) y el *craving* por el consumo (Paparrigopoulos y cols., 2011; Batki y cols., 2014; Feinn y cols., 2016). Se ha descrito que incrementa el nivel de retención (adherencia) al tratamiento, con lo que se prolonga el tiempo de abstinencia, observándose también, que se reducen los porcentajes de recaída considerablemente (Baltieri y cols., 2008). Comparado con otros fármacos utilizados en dependientes al alcohol, se ha equiparado su efectividad a la naltrexona (Flórez y cols., 2008), mientras que su utilidad queda puesta en duda en comparación al disulfiram (De Sousa y cols., 2008). En otro ámbito de actuación, el tratamiento con TPM en pacientes dependientes al alcohol ha demostrado estar relacionado con una

## **Tratamiento farmacológico**

Tabla 1. Resumen de los ensayos clínicos con conclusiones negativas (A) o positivas (B) acerca de la utilidad del TPM como tratamiento en la dependencia a la cocaína y otras drogas.

### **(A) Estudios clínicos: resultados negativos**

<b>Efectividad del TPM</b>	<b>Droga de abuso</b>	<b>Autores</b>
TPM=placebo Abstinencia a la cocaína.	Cocaína y opiáceos	Umbricht y cols., 2014
TPM=placebo Adherencia al tratamiento, uso o <i>craving</i> .	Cocaína crack	Nuijten y cols., 2014
TPM= placebo Uso o <i>craving</i> .	Cocaína y alcohol	Kampman y cols., 2013
TPM>placebo Euforia en bajas dosis de cocaína.	Cocaína	Johnson y cols., 2013b
TPM=placebo Abstinencia a la cocaína.	Metanfetamina	Elkashef y cols., 2012
TPM>placebo Efectos subjetivos positivos asociados al consumo de metanfetaminas	Metanfetamina	Johnson y cols., 2007
TPM<disulfiram Efectividad del tratamiento a la dependencia.	Alcohol	De Sousa y cols., 2008

## Tratamiento farmacológico

Tabla 1. Resumen de los ensayos clínicos con conclusiones negativas (A) o positivas (B) acerca de la utilidad del TPM como tratamiento en la dependencia a la cocaína y otras drogas (cont.)

### (B) Estudios clínicos: resultados positivos

Efectividad del TPM	Droga de abuso	Autores
TPM < placebo Cantidad empleada y frecuencia de uso de la cocaína	Cocaína (crack)	Baldaçara y cols., 2016
TPM > placebo Abstinencia a la metanfetamina TPM<placebo <i>Craving</i> , severidad de uso y necesidad de la droga	Metanfetamina	Rezaei y cols., 2016
TPM < placebo Días de consumo intenso de alcohol. Asociado a más sensación de efectos secundarios.	Alcohol	Feinn y cols., 2016
TPM > placebo Abstinencia a la cocaína.	Cocaína	Johnson y cols., 2013a
TPM>placebo Adherencia al tratamiento y tiempo de abstinencia (tres últimas semanas del ensayo).	Cocaína y alcohol	Kampman y cols., 2013
TPM<placebo Efectos reforzantes inducidos por la cocaína y <i>craving</i> en altas dosis de cocaína.	Cocaína	Johnson y cols., 2013b
TPM<placebo <i>craving</i>	Cocaína	Reis y cols., 2008
TPM>placebo Abstinencia a la cocaína.	Cocaína	Kampman y cols., 2004
TPM<placebo, consumo de alcohol	Alcohol	Knapp y cols., 2015



## **Tratamiento farmacológico**

*Tabla 1. Resumen de los ensayos clínicos con conclusiones negativas (A) o positivas (B) acerca de la utilidad del TPM como tratamiento en la dependencia a la cocaína y otras drogas (cont.)*

<b>Efectividad del TPM</b>	<b>Droga de abuso</b>	<b>Autores</b>
TPM<placebo consumo de alcohol y craving	Alcohol	Batki y cols., 2014
TPM<placebo <i>craving</i> , y síntomas de depresión y ansiedad asociados al comienzo de la fase de abstinencia. TPM>placebo Abstinencia a la cocaína.	Alcohol	Paparrigopoulos y cols., 2011
TPM>placebo Abstinencia a la cocaína y retención al tratamiento.	Alcohol	Baltieri y cols., 2008
TPM>placebo Mejora en factores psicosociales.	Alcohol	Johnson y cols., 2008
TPM=Naltrexona Eficiente en el tratamiento de la dependencia al alcohol.	Alcohol	Flórez y cols., 2008
TPM<placebo consumo de alcohol	Alcohol	Miranda y cols., 2008
TPM<placebo Días de consumo elevado de alcohol	Alcohol	Johnson y cols., 2007

### ***Tratamiento farmacológico***

mejora de los factores psicosociales (Johnson y cols., 2004; Johnson y cols., 2008) mejorando la calidad de vida de los pacientes dependientes y su entorno.

Los resultados obtenidos en el tratamiento por abuso del alcohol señalan al TPM como fármaco a tener presente en el tratamiento de adicción a otras sustancias de abuso. Además de su actuación como modulador neuronal, es de señalar que posee una elevada biodisponibilidad (80%) y una larga vida media (entre 19 y 25 horas), con lo cual podría resultar adecuado para tratar la reducida actividad del GABA en dependientes a la cocaína (Kim y Lawrence, 2014). Por otro lado, el tratamiento con TPM ha mostrado una reducción de los síntomas de depresión y ansiedad (Paparrigopoulos y cols., 2011), sintomatología que concurre en los sujetos que consumen cocaína.

En cuanto al tratamiento de la dependencia a la cocaína utilizando el TPM, Johnson y colaboradores (2013a) obtuvieron datos a favor de dicho propósito. Encuentran que el TPM es más eficiente que el placebo para incrementar la proporción semanal de días en los cuales los dependientes no consumieron cocaína, además de aumentar la probabilidad de que las pruebas de orina realizadas semanalmente a los pacientes fueran negativas. Kampman y colaboradores (2004), informan que en dependientes a la cocaína, la administración de TPM prolongaba el tiempo que mantenían la abstinencia. En estudios

posteriores observan que el tratamiento con TPM era más efectivo en los sujetos que presentaban mayor severidad en los síntomas de abstinencia, así como que aumentaba la probabilidad de mantener el tratamiento. Sin embargo, estos resultados satisfactorios se obtuvieron cuando el tratamiento con TPM se realizaba junto con terapia cognitivo-conductual (Kampman y cols., 2013). Al mismo tiempo, los sujetos tratados con TPM informaban de la disminución de la intensidad y duración del *craving* (Johnson y cols., 2013a; Reis y cols., 2008); pero también se observa que la dosis utilizada parecía ser determinante, propiciando una reducción del *craving* con una dosis alta y produciendo un efecto opuesto y por tanto perjudicial a dosis bajas (Johnson y cols., 2013b). Estudios muy actuales también apuntan datos positivos: el TPM resulta más efectivo que el placebo en la cantidad y frecuencia de uso de la cocaína *crack* (Baldaçara y cols., 2016), o en el caso de la metanfetamina, otro psicoestimulante, aumenta el tiempo de abstinencia y reduce el nivel de *craving* de los pacientes dependientes (Rezaei y cols., 2016).

Esta variabilidad de resultados se produce también en estudios que han utilizado la metanfetamina: Elkashef y colaboradores (2012) informan que el TPM no fue capaz de aumentar los niveles de abstinencia en el consumo, mientras que sí era beneficioso a la hora de disminuir la severidad de la dependencia, y habían observado una disminución de los niveles de metanfetamina en orina; los autores

### ***Tratamiento farmacológico***

consideran que puede ser un fármaco útil a la hora de reducir los ratios de recaída de los participantes que se mantuvieron abstinentes. Sin embargo, se informa que la administración de TPM en consumidores de metanfetamina produce un aumento de los efectos subjetivos positivos de esta droga (Johnson y cols., 2007). Estos resultados parecen indicar la utilidad del TPM como tratamiento a la dependencia, pero también apuntan a que puede estar actuando como un sustituto de la droga. Sin embargo, en dependientes a la cocaína-crack, no se ha observado mejora en el *craving*, ni disminución en el uso de la sustancia, ni una mayor retención al tratamiento cognitivo-conductual al que los pacientes fueron sometidos (Nuijten y cols., 2014). Los autores señalan que aunque el TPM es usualmente bien tolerado, ya que no produce efectos secundarios severos, muchas veces la aceptación es generalmente baja y solo un bajo porcentaje de participantes mantienen el consumo a lo largo de las semanas, quizás debido a que no abastece a los participantes de una sensación de valor añadido.

Los trabajos realizados en policonsumidores no informan de resultados positivos para el tratamiento con TPM. Umbrich y colaboradores (2014) no observaron diferencias entre TPM y placebo en la abstinencia a la cocaína en pacientes dependientes a cocaína y opiáceos que están siendo tratados con metadona y el estudio de Kampman y colaboradores (2013) informan que el TPM no es más

efectivo que el placebo a la hora de reducir el uso de cocaína o alcohol, en una muestra de dependientes al alcohol y la cocaína. Tras los prometedores resultados obtenidos con el tratamiento del TPM para la dependencia al alcohol, en la dependencia a la cocaína los resultados son controvertidos; el reciente metaanálisis realizado por Minozzi y colaboradores (2015) aporta información en este debate, apuntando que, en la comparación de anticonvulsivantes versus placebo, no encontraron diferencias significativas en eficacia frente al tratamiento de la dependencia a la cocaína por lo que concluyen que, actualmente, no hay evidencia científica que apoye el uso de medicamentos anticonvulsivantes en el tratamiento de pacientes con dependencia a la cocaína.

En el ámbito de la investigación preclínica, el TPM también ha tenido efectos prometedores produciendo, por ejemplo, una reducción en el consumo de etanol (Hargreaves y McGregor, 2007; Nguyen y cols., 2007; Lynch y cols., 2011; Zalewska-Kasubaska y cols., 2013), así como una reducción del consumo en ratas con preferencia al etanol, aunque esto no se observó en ratas con baja preferencia al etanol (Breslin y cols., 2010; Moore y cols., 2014a) (Tabla 2). También se ha observado una reducción de la preferencia por el mismo (Gabriel y Cunningham, 2005) y de los efectos reforzantes del etanol (Moore y cols., 2014a). En otros estudios, por el contrario, el TPM no ha reducido los efectos

## Tratamiento farmacológico

Tabla 2: Resumen de los estudios preclínicos con conclusiones negativas (A) o positivas (B) acerca de la utilidad del TPM como tratamiento en la dependencia a la cocaína y otras drogas.

### (A) Estudios preclínicos: resultados negativos

Efectividad del TPM	Droga de abuso	Autores
TPM=control	Cocaína	Echeverry-Alzate y cols., 2014
Consumo de EtOH y reactividad locomotora a la cocaína	Etanol (EtOH)	
TPM=control	Cocaína	Le Foll y cols., 2008
Efectos subjetivos de la cocaína		
TPM=control	Metanfetamina	Tatsuta y cols., 2007
Efectos reforzantes de la metanfetamina.		
TPM=control	EtOH	Gremel y cols., 2006
Efectos reforzantes del EtOH		

Tabla 2: Resumen de los estudios preclínicos con conclusiones negativas (A) o positivas (B) acerca de la utilidad del TPM como tratamiento en la dependencia a la cocaína y otras drogas (cont.)

## *Tratamiento farmacológico*

### (B) Estudios preclínicos: resultados positivos

<b>Efectividad del TPM</b>	<b>Droga de abuso</b>	<b>Autores</b>
TPM<control Nivel de EtOH en sangre. Previene el incremento de consumo de EtOH que produce la cocaína de una manera dosis-dependiente.	Cocaína + EtOH	Echeverry-Alzate y cols., 2014
No tiene efectos reforzantes en sí mismo.	Metanfetamina	Tatsuta y cols., 2007
Reduce los efectos reforzantes del EtOH en administración aguda	EtOH	Moore y cols., 2014 a
TPM+Naltrexona, reduce el consumo de ratas con preferencia al EtOH, aunque no en ratas WT	EtOH	Moore y cols., 2014 b
TPM reduce el consumo voluntario de EtOH	EtOH	Zalewska-Kaszubska y cols., 2013
Reduce de forma débil pero estable el consumo de EtOH, tras administración aguda.	EtOH	Lynch y cols., 2011
Reduce de forma débil pero estable el consumo de EtOH en ratas con preferencia al EtOH, aunque no en ratas WT.	EtOH	Breslin y cols., 2010
Reduce de forma débil el consumo de EtOH.	EtOH	Hargreaves y McGregor, 2007
Reduce el consumo de EtOH	EtOH	Nguyen y cols., 2007
Reduce la preferencia por el EtOH, así como también reduce el consumo de sacarina	EtOH	Gabriel y Cunningham, 2005

### ***Tratamiento farmacológico***

reforzantes del etanol (Gremel y cols., 2006) o el nivel de consumo (Echeverry-Alzate y cols., 2014).

En cuanto a los estudios preclínicos realizados con psicoestimulantes los resultados son poco esclarecedores: aunque el TPM no ha demostrado tener efectos reforzantes en sí mismo (Tatsuta y cols., 2007), no parece reducir los efectos subjetivos (Le Foll y cols., 2008), ni los efectos reforzantes de la metanfetamina (Tatsuta y cols., 2007), mientras que previene el incremento del consumo de etanol que produce la cocaína (Echeverry-Alzate y cols., 2014).

Como puede observarse, son muchos los estudios clínicos realizados para conocer la efectividad del TPM en el tratamiento de la dependencia a la cocaína. Se han obtenido resultados diversos, por lo que su utilidad sigue estando en duda. La investigación preclínica permite dilucidar resultados controvertidos y ofrece una respuesta clara en muchas ocasiones. Es evidente que los modelos animales no pueden reproducir la complejidad social asociada al consumo de drogas pero, aun así, poseen ciertas ventajas que facilitan el estudio de la drogadicción, complementando y/o ratificando la divergencia de resultados. Las bases neurales de cómo podría estar influyendo un fármaco, como en este caso el TPM, en la plasticidad inducida por la cocaína pueden investigarse con los modelos animales para el estudio de la adicción a las drogas.



## 5. Modelos animales para el estudio de la adicción a las drogas



El empleo de modelos animales en el estudio de los mecanismos de adicción es de vital importancia para ampliar el conocimiento de los mismos. Resultan útiles ya que permiten el control de variables experimentales, como son la dosis administrada, la duración del tratamiento o la edad de exposición entre otros factores, posibilitando establecer relaciones de causa-efecto. Por supuesto, también poseen claras desventajas ya que es imposible reproducir de manera completa, mediante modelos animales, la complejidad de la drogadicción en seres humanos, pero sí son capaces de recrear algunos aspectos de la patología. Los modelos animales, como todo modelo que se precie, han de estar basados en los criterios estándar de validez y fiabilidad. La fiabilidad hace referencia a la estabilidad y la consistencia con que las variables son medidas. Por otro lado, la validez presenta tres aspectos: validez de constructo, para indicar que el control de las variables sea equiparable entre el modelo animal y lo que ocurre en el trastorno objeto de estudio; validez aparente, que se considera el punto de partida de los modelos animales, se refiere a que los síndromes animales que se producen deben asemejarse a los que se encuentran en los seres humanos; y validez predictiva, que hace referencia tanto a la capacidad del modelo para predecir el potencial terapéutico de una sustancia, como a la capacidad del modelo para llegar a predicciones precisas sobre el fenómeno humano que se quiere investigar. En este sentido, los principales modelos animales utilizados para el estudio de la adicción poseen buena fiabilidad y

## ***Modelos animales***

validez (Belin-Rauscent y Belin, 2012; Koob y cols., 2014; Becker y Koob, 2016).

### **5.1. Principales paradigmas en la evaluación del refuerzo**

Los dos principales modelos animales empleados en el estudio de los procesos adictivos son la autoadministración (AA) y el condicionamiento de preferencia de lugar (CPL). Estos modelos evalúan de manera diferente y complementaria los efectos reforzantes de las drogas, reflejando características relevantes de la adicción a las drogas útiles para poder comprender su efecto y combatir su consumo con mayor eficacia. Utilizando ambos procedimientos se han modulado los procesos de extinción/reinstauración para reproducir una situación similar a la recaída en el consumo de una droga tras un periodo de abstinencia (Aguilar y cols., 2009).

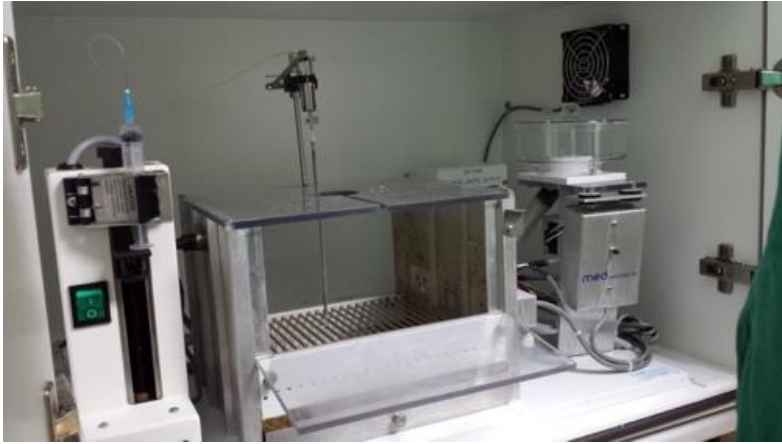
#### **5.1.1. Autoadministración**

El modelo de AA de fármacos es un modelo animal de abuso y dependencia ampliamente utilizado: es un procedimiento que permite el estudio de los efectos reforzantes de las drogas que el animal consume realizando una conducta operante (Thomsen y Caine, 2007).

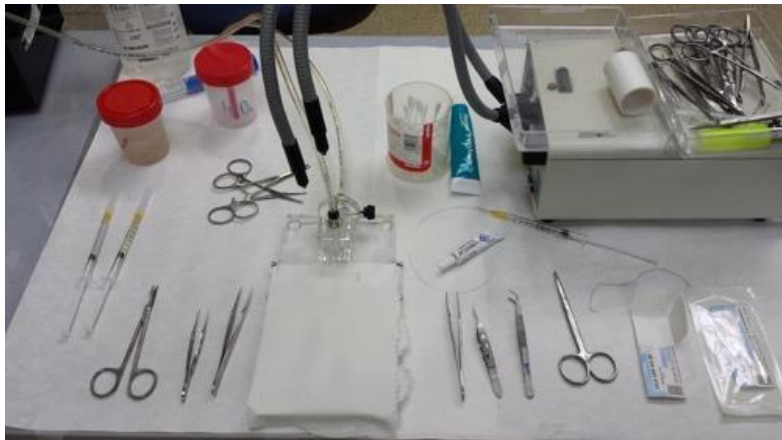
El modelo de AA muestra patrones de consumo realizados por los animales experimentales, simulando el consumo voluntario humano (Caine y Koob, 1993; Deroche-Gamonet y cols., 2004; Yap y Miczek, 2008). Este es el modelo más directo para evaluar las propiedades reforzantes primarias de una sustancia, observándolo a través del esfuerzo que van a realizar en la búsqueda y consecución de la droga (Yahyavi-Firouz-Abadi y See, 2009; Moser y cols., 2011). En este procedimiento se entrena a los animales a realizar una respuesta (pulsar una palanca o la realización de un *nose-poke*), para poder auto-administrarse un fármaco (Figura 9). Como consecuencia, el animal adquiere un condicionamiento operante (Yahyavi-Firouz-Abadi y See, 2009). Este modelo es el que mejor replica el consumo de drogas humano, tanto la posible ruta de consumo (por ejemplo intravenosa) como por el tipo de administración, contingente a la conducta del animal, o la frecuencia “patrón” del consumo (O’Connor y cols., 2011). Es de señalar que una clara desventaja de esta técnica es la complejidad cuando es un tipo de AA intravenosa (Figura 10) o intracerebral, debido a la cirugía necesaria para implantar el catéter en la yugular o a nivel intracraneal (Graf y cols., 2011).

Como la AA cuantifica la conducta que realiza el animal para administrarse la droga y también para conseguirla, es decir, ofrece una medida del consumo y del esfuerzo que está dispuesto a realizar para consumir, esta técnica es utilizada para estudiar los mecanismos

## *Modelos animales*



*Figura 9. Caja de autoadministración para ratones.*



*Figura 10. Material quirúrgico necesario para implantar el catéter intravenoso en ratones.*

neurobiológicos implicados en el refuerzo y en la búsqueda de la droga (Stewart, 2000; See, 2005). Para evaluar el valor del refuerzo de una

droga, los procedimientos operantes emplean un programa de razón fija (FR), donde el animal ha de realizar un número determinado de respuestas no variables a lo largo del procedimiento, para así conseguir una infusión de droga. De esta manera, el número de respuestas válidas del animal para conseguir una infusión, suele ser mayor cuanto mayores sean las propiedades reforzantes de una droga (Moser y cols., 2011). Además de los programas de ratio fija, también se han desarrollado los programas de razón progresiva (PR), donde se va aumentando de manera gradual el número de respuestas necesarias para que el animal obtenga la infusión de droga deseada. De esta manera, se puede evaluar la motivación que el animal tiene por consumir la droga (Tabakoff y Hoffman, 2000). Otro índice de la motivación y del esfuerzo que el animal tiene para conseguir la droga se obtiene con el denominado “*breaking point*” o “punto de corte” que determina el punto donde el animal alcanza el máximo de respuestas para obtener una dosis utilizando un programa de razón progresiva donde la administración de la droga requiere respuestas cada vez mayores (Yap y Miczek, 2008).

### **5.1.2. Condicionamiento de Preferencia de Lugar**

El paradigma de CPL es un método que sirve para evaluar los efectos reforzantes condicionados inducidos por sustancias adictivas (Bardo y Bevins, 2000; Tzschentke, 2007), siendo ampliamente utilizado para

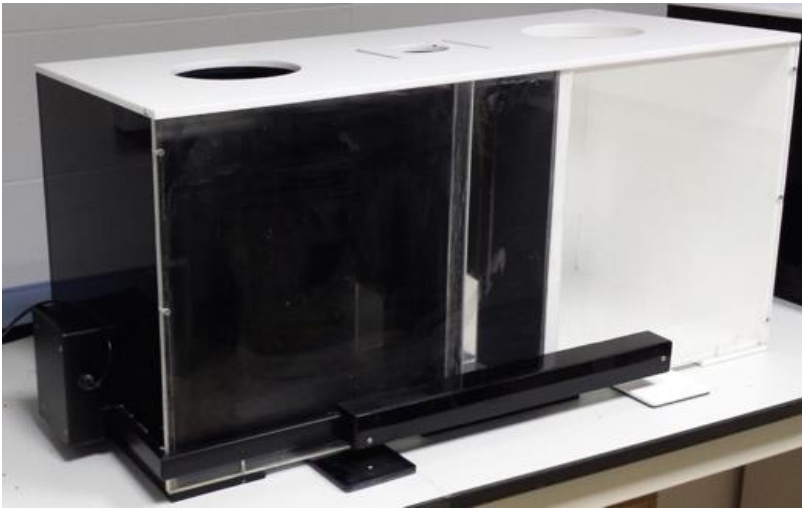
### ***Modelos animales***

estudiar el refuerzo condicionado inducido por las sustancias de abuso (Aguilar y cols., 2009). Se trata de un procedimiento que evalúa de manera rápida y sencilla el valor hedónico de una droga (Moser y cols., 2011). En este paradigma, los estímulos ambientales adquieren propiedades apetitivas secundarias (efectos reforzantes condicionados) cuando se combinan con un reforzador primario como las drogas (Tzschentke, 2007).

Siguiendo las bases del condicionamiento clásico, un entorno que en un principio resulta neutral (como el color de un compartimiento o la textura del suelo en la caja de CPL, Figura 11) se asocia con los efectos de una droga de abuso durante varias sesiones de condicionamiento (Manzanedo y cols., 2001), mientras que el otro compartimiento se asocia con la inyección de un vehículo o control sin efectos. Después del condicionamiento, si el animal pasa más tiempo en el compartimiento previamente asociado con la droga, se asume que ha desarrollado CPL (Aguilar y cols., 2009). El animal, a través de mecanismos de refuerzo condicionado, atribuye valor de incentivo positivo a las señales asociadas con el reforzador primario, y por lo tanto realizará respuestas voluntarias de búsqueda (acercamiento) de dicho entorno asociado, o bien respuestas de evitación del entorno condicionado en el caso de que la sustancia le haya resultado aversiva. Existen varios tipos de procedimientos y protocolos de administración de la droga, tiempo de asociación y número de sesiones de



condicionamiento (Tzschentke, 1998). Además, el CPL puede ser sensible a una amplia gama de sustancias, incluyendo los psicoestimulantes (Moser y cols., 2011).



*Figura 11. Caja empleada en el condicionamiento de preferencia de lugar.*

## **5.2. Pruebas conductuales para evaluar otros efectos de las drogas**

Además de la evaluación del efecto reforzante de las drogas, se han desarrollado otras pruebas para estudiar aspectos relevantes en el proceso adictivo. El estudio del nivel de la ansiedad, de la exploración ambiental o de la actividad locomotora, complementa la información recogida utilizando los dos grandes paradigmas mencionados.

## **Modelos animales**

### **5.2.1. Hole-board**

El test *Hole-board* fue desarrollado por J.R. Boissier y P. Simon. Estos investigadores publicaron en 1962 un artículo titulado “*The exploration reaction in the mouse. Preliminary note*”, en el cual señalaban la utilidad de la prueba para medir la exploración. En 1964 publicaron otro artículo titulado “*Use of a particular mouse reaction (Hole Board Method) for the study of psychotropic drugs*”, donde explicaban los fundamentos del test. Como ya hemos mencionado en una sección anterior de la presente Tesis Doctoral, esta prueba proporciona una manera sencilla de evaluar la respuesta de un animal ante un ambiente desconocido, utilizando como medida el número de veces que el animal introduce la cabeza en los agujeros del aparato (*head dipping*; nº de *dips*) (ver Figura 12). Utilizando los resultados de esta prueba se puede diferenciar a los animales como altos- o bajos-NS. Concretamente, el test *hole-board* es uno de los modelos de búsqueda de la novedad de libre elección, donde el animal escoge atender o no al estímulo (Piazza y cols., 1989; Klebaur y cols., 2001; Nadal, 2008; Philpot y Wecker, 2008; Belin y cols., 2011), y se considera que dicha medida representa la tendencia exploratoria natural del animal, la cual es diferente de la actividad locomotora general (ver Calabrese, 2008).



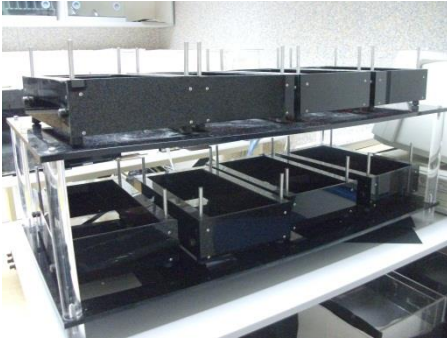
*Figura 12. Aparato hole-board.*

### **5.2.2. Actividad motora**

El registro de la actividad motora que el animal desarrolla en un espacio, como por ejemplo la medida de la longitud del espacio recorrido o el movimiento realizado, nos ofrece un índice de actividad y de la tendencia del animal a reaccionar ante un espacio novedoso. Uno de los aparatos adecuados para el registro de la actividad locomotora de los animales es la utilización de un actímetro, el cual registra la actividad locomotora del animal de manera automática (Figura 13). Como hemos apuntado en secciones anteriores, la evaluación del nivel de actividad motora espontánea puede emplearse como índice de reactividad a la novedad (Nadal, 2008; Belin y cols., 2011; Arenas y cols., 2016).

Por otro lado, también se puede realizar una evaluación de la actividad locomotora tras una administración aguda de un fármaco. En este caso, se evalúa la respuesta locomotora bajo el efecto de una determinada droga. Este tipo de evaluación locomotora es utilizada

## ***Modelos animales***



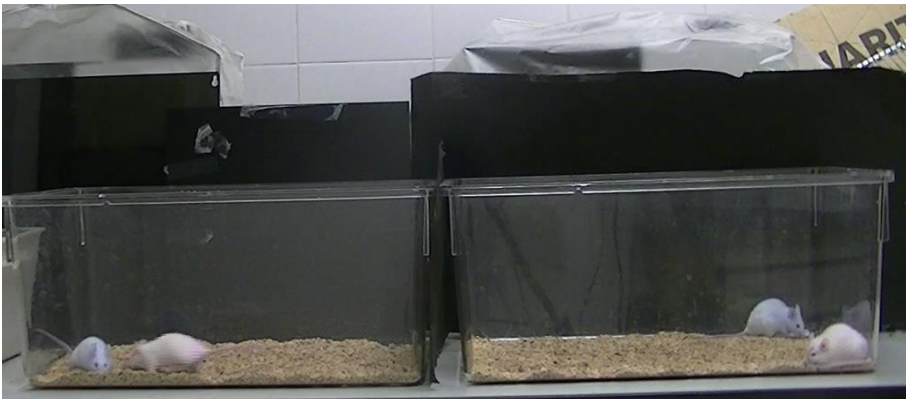
*Figura 13. Actímetro*

frecuentemente en la evaluación de la acción conductual de algunas drogas, como la cocaína, ya que la activación conductual es característica de los psicoestimulantes (Yamamoto y cols., 2013). Dicha activación motora producida por los psicoestimulantes es dependiente, a nivel neuroquímico y neurofisiológico, del incremento de la transmisión dopaminérgica que a su vez está influyendo en el estriado, y que están a la base del incremento de actividad locomotora (Rebec, 2006).

### **5.2.3. Test de interacción social**

Los roedores, al igual que los seres humanos, muestran un amplio rango de conductas sociales, y su evaluación puede permitir a la investigación preclínica la evaluación de los efectos a nivel social que las sustancias de abuso pueden provocar (Blanco-Gandía y cols., 2015). El test de interacción social registra las diversas conductas del animal experimental frente a un congénere, valorándolas mediante un

etograma (conductas típicas de especie). Esta evaluación computarizada tuvo su origen en el Laboratorio del profesor Paul F. Brain del University College de Swansea, Gales, (Brain y cols., 1989; ver en Martínez y cols., 1991). Empleando la descripción de la conducta en estado natural realizada por Martínez y colaboradores (1991), se puede observar y evaluar un amplio repertorio de actos y posturas denominados “elementos”. La observación de un encuentro con un igual y el registro de dichos elementos permiten cuantificar la conducta social del animal experimental, tanto en estado natural como bajo el efecto de una droga o en la abstinencia de ella (Rodríguez-Arias y cols., 1998) (ver Figura 14).



*Figura 14. Test de interacción social*

Esta aproximación nos permite observar posibles alteraciones producidas por las drogas de abuso, ya que cambios específicos en este test están relacionados con una alteración del nivel de ansiedad

## ***Modelos animales***

de los animales (File y Seth, 2003), dato de gran relevancia ya que los trastornos por uso de sustancias suelen correlacionar con los trastornos de ansiedad (Ruglass y cols., 2014). La relación entre el abuso de sustancias y la conducta agresiva también ha sido claramente establecida (ver Rodríguez-Arias y cols., 2005). Además, este paradigma es empleado para evaluar cómo interacciones positivas o negativas con congéneres pueden proteger al sujeto frente a las conductas adictivas, o por el contrario facilitarlas (Neisewander y cols., 2012).

### **5.2.4. Laberinto elevado en cruz**

El laberinto elevado en cruz (LEC) fue desarrollado por Pellow y colaboradores (Pellow y cols., 1985) para evaluar los efectos ansiolíticos y ansiogénicos de las drogas en la actividad exploratoria de los ratones. Desde entonces y aún hoy en día, el LEC es comúnmente utilizado en el estudio de las bases neurobiológicas de la ansiedad, así como en la evaluación inicial de fármacos potencialmente ansiolíticos (Ennaceur y Chazot, 2016). Es un sistema para valorar el nivel de ansiedad interesante, ya que de una forma sencilla, ofrece datos fiables acerca del poder ansiogénico o ansiolítico de una sustancia, sin necesidad de un entrenamiento previo. El LEC posee un adecuado poder predictivo del nivel de ansiedad (Calabrese, 2008).

Este test aprovecha la tendencia natural de exploración de los roedores, posicionándolos en un laberinto elevado con dos brazos opuestos abiertos, y dos brazos opuestos cerrados (Walf y Frye, 2007). Habitualmente, los cambios en el nivel de ansiedad se evalúan teniendo en cuenta el tiempo en los brazos abiertos: en condiciones naturales, los animales invertirán un menor tiempo en brazos abiertos puesto que la falta de protecciones ante la altura del laberinto producirá una mayor ansiedad en los animales y por tanto una menor exploración de esos brazos. Según el nivel de ansiedad de los animales, invertirán un mayor o menor tiempo en los brazos abiertos del laberinto, entendiendo que un mayor tiempo en brazos abiertos es un indicativo de efecto ansiolítico (Calabrese, 2008) (Figura 15).



*Figura 15: Laberinto elevado en cruz.*

Ennaceur y Chazot, 2016 plantean que el modelo posee sus limitaciones; explican que los resultados obtenidos en el LEC podrían no ser un indicador inequívoco del nivel de ansiedad y que debería ser considerado como un test para medir la preferencia natural del animal

## ***Modelos animales***

por los espacios cerrados. Sin embargo, este test ha resultado bueno discriminando las respuesta de subpoblaciones, como se ha mostrado en estudios preclínicos: el empleo de este test en el estudio de las sustancias de abuso nos ha informado que la administración tipo *binge* de una droga durante la adolescencia produce un efecto ansiolítico a largo plazo, en la respuesta que induce la cocaína (Estellés y cols., 2007), el etanol en animales altos-NS (Montagud-Romero y cols., 2014) o la MDMA en animales bajos-NS (Rodríguez-Arias y cols., 2015). Por el contrario, se observa un efecto ansiogénico si el *binge* de cocaína es administrado durante la adultez (Estellés y cols., 2007). Por otro lado, el tiempo en brazos abiertos no se ve alterado cuando la cocaína es administrada en agudo (Daza-Losada y cols., 2009). Todos estos resultados nos hacen ver que los resultados obtenidos mediante el LEC muestran la neuroplasticidad inducida por una administración de tipo *binge*, mientras que en agudo no discrimina diferencias en el nivel de ansiedad de los animales.

Además de los modelos animales clásicos, una nueva generación de modelos preclínicos, basada en el refinamiento de los modelos ya existentes, se están desarrollando. Esta nueva generación de modelos, intentan enmarcar los substratos fisiopatológicos de la adicción, y su asociación con los endofenotipos que pueden estar marcando una vulnerabilidad a la drogadicción (Belin-Rauscent y cols., 2016).



## 6. Hipótesis y Objetivos



### **6.1. Hipótesis general**

Un consumo intensivo de drogas como el alcohol y la cocaína durante la adolescencia, puede incrementar la vulnerabilidad a desarrollar un trastorno por abuso de sustancias al llegar a la adultez. Los efectos a largo plazo de esta exposición temprana a las drogas parecen depender de las características individuales de los sujetos. Así, ciertos rasgos de personalidad, como el nivel de búsqueda de la novedad, y el sexo de pertenencia pueden diferenciar su impacto a largo plazo. Por ello, consideramos que los ratones categorizados como altos buscadores de la novedad expuestos al alcohol o a la cocaína durante la adolescencia presentarán de adultos una mayor sensibilización a los efectos de drogas como la cocaína y la MDMA, incluso un mayor consumo de la cocaína, y este efecto lo observaremos de manera más marcada en las hembras que en los machos.

Además, el topiramato es un fármaco anticonvulsivo con una acción neurofarmacológica sobre la actividad dopaminérgica mesolímbica que parece ser útil para atenuar las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, por lo que se considera como un posible tratamiento en la adicción a la cocaína. Así, hemos querido evaluar su eficacia para bloquear los efectos reforzantes de la cocaína en el condicionamiento de preferencia de lugar. Nuestra hipótesis es que el topiramato puede reducir los efectos reforzantes condicionados de la cocaína, y disminuir la búsqueda compulsiva de la droga.

## ***Hipótesis y objetivos***

### **6.2. Objetivo general**

Evaluar la influencia a largo plazo que factores de vulnerabilidad durante la adolescencia, tales como una exposición temprana al alcohol y a la cocaína en patrón de consumo tipo “*binge*”, rasgos de personalidad como el nivel de búsqueda de la novedad, o la pertenencia al género masculino o femenino, pueden tener sobre los efectos reforzantes de la cocaína y otras drogas, y su nivel de consumo en sujetos adultos; y valorar un posible fármaco que pueda reducir los efectos reforzantes de la cocaína en modelos animales, y así ser útil en el tratamiento de la dependencia a la cocaína.

### **6.3. Objetivos específicos**

1. Determinar la influencia que tiene ser un alto buscador de la novedad en los efectos a largo plazo de una administración intensiva “*binge*” de cocaína durante la adolescencia sobre la conducta espontánea del ratón adulto: nivel de ansiedad (LEC), actividad motora, nivel de búsqueda de la novedad (*hole-board*) y conducta en interacción social (Estudio 1).

2. Evaluar la influencia que tiene ser un alto buscador de la novedad en los efectos a largo plazo de una administración intensiva “*binge*” de cocaína durante la adolescencia sobre los efectos

reforzantes de la cocaína y de la MDMA en los ratones adultos, utilizando el procedimiento de CPL (Estudio 1).

4. Determinar los efectos a largo plazo de una administración intensiva e intermitente “*binge*” de etanol durante la adolescencia sobre la actividad locomotora espontánea de ratones machos y hembras adultos, así como sobre los efectos motores de la cocaína (Estudio 2).

5. Determinar los efectos a largo plazo de una administración intensiva e intermitente “*binge*” de etanol durante la adolescencia sobre los efectos reforzantes (CPL) y el nivel de consumo (AA) de la cocaína en ratones adultos machos y hembras (Estudio 2).

6. Evaluar la eficacia del topiramato, administrado de manera contingente a la cocaína, para bloquear la adquisición y expresión del refuerzo condicionado inducido por diferentes dosis de cocaína (CPL) (Estudio 3).

7. Evaluar la eficacia del topiramato, administrado mediante un tratamiento crónico previo al contacto con la droga, para bloquear o reducir los efectos reforzantes de la cocaína en el CPL (Estudio 3).

### ***Hipótesis y objetivos***

8. Evaluar la eficacia del topiramato, administrado en un patrón de tratamiento crónico posterior a la adquisición del CPL, para reducir el tiempo de extinción de la conducta de búsqueda de la cocaína (Estudio 3).

# 7. Metodología y resultados





**7.1. Estudio 1: Mayor sensibilidad a los efectos reforzantes condicionados de la cocaína y la MDMA de los ratones adultos altos buscadores de la novedad expuestos a un consumo intensivo de cocaína durante la adolescencia.**

Este estudio está publicado en la revista *Psychopharmacology* (2015) 232(1):101-13. doi: 10.1007/s00213-014-3642-y

**7.1.1. Introducción**

La adolescencia es un período vital durante el cual el sistema nervioso aún está en desarrollo, y se caracteriza por presentar un incremento en la exploración y las conductas de alto riesgo, incluyendo el abuso de sustancias (Casey y Jones, 2010; Spear, 2011). Los estudios preclínicos han demostrado que durante la adolescencia el equilibrio entre los efectos aversivos y reforzantes de las drogas tiende a inclinarse hacia los efectos reforzantes (para una revisión ver Schramm-Sapyta y cols., 2009), lo que puede explicar el mayor consumo de las drogas de abuso observado en los adolescentes.

## **Estudio 1**

La experimentación con las drogas durante la adolescencia puede tener efectos a largo plazo sobre la conducta en la edad adulta. Los cambios estructurales y funcionales en el sistema de recompensa del cerebro han sido observados en sujetos adictos a la cocaína, como por ejemplo, una reducción de la materia gris en el córtex orbitofrontal medial (COF) (Tanabe y cols., 2009). Estudios realizados en modelos animales han demostrado que la exposición crónica de cocaína altera la inducción de  $\Delta$ FosB y CaMKII en el núcleo accumbens (NAcc) (Robison y cols., 2013) e induce cambios en las regiones del cerebro implicadas en la adicción (NAcc, cuerpo estriado, la corteza insular, COF, y haz medial del cerebro anterior), siendo estos efectos más pronunciados en los animales expuestos durante la adolescencia (Wheeler y cols., 2013). Además, también se ha observado una mayor respuesta dopaminérgica después de la administración de la cocaína en adolescentes (Badanich y cols., 2006; Walker y Kuhn, 2008). Se ha demostrado también que un tratamiento de cocaína durante la adolescencia altera la inducción de  $\Delta$ FosB en el NAcc (Ehrlich y cols., 2002), la expresión de genes en el córtex prefrontal (CPF) (Black y cols., 2006), la actividad locomotora inducida por la cocaína (Black y cols., 2006; Caster y cols., 2005; Wheeler y cols., 2013), el condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) inducido por la MDMA (Daza-Losada y cols., 2009), la respuesta a la novedad (Stansfield y Kirstein, 2007) y el nivel de ansiedad (Sullivan y cols., 2011) cuando son evaluadas en la edad adulta. Estos cambios a largo plazo podrían contribuir a una

mayor vulnerabilidad al abuso de drogas en las personas que han tenido un contacto temprano con las drogas de abuso (Wittchen y cols., 2008). La alta tasa de consumo de cocaína en la población juvenil (OEDT, 2013) justifica un estudio más profundo de las consecuencias conductuales a largo plazo del uso de esta droga durante la adolescencia.

Además de la edad, los factores de personalidad también pueden explicar las diferencias entre los individuos con respecto a la vulnerabilidad al abuso y dependencia de las drogas (Dellu y cols., 1996). El rasgo de búsqueda de novedad (*novelty-seeking*, NS) ha sido identificado como un factor de riesgo significativo para el inicio del consumo de drogas y la transición del uso al abuso (Milivojevic y cols., 2012; Kelley y cols., 2004; Staiger y cols., 2007). En roedores, el rasgo de NS se ha definido como una preferencia por objetos o ambientes nuevos, o un aumento en la exploración de nuevas situaciones, objetos o estímulos desconocidos (Ballaz y cols., 2007; Nadal-Aleman, 2008; Belin y cols., 2011; Vidal-Infer y cols., 2012). Dos enfoques diferentes se utilizan para modelar el rasgo de NS: la actividad locomotora inducida por la novedad (es decir, alta reactividad locomotora a un nuevo entorno inescapable versus bajos respondedores a la novedad) y la preferencia por la novedad (es decir, alta propensión a explorar la novedad en un procedimiento de libre elección/ altos versus bajos buscadores de la novedad, *high-NS vs. low-*

## **Estudio 1**

NS, HNS vs LNS) (Philpot y Wecker, 2008; Nadal-Aleman, 2008). Se ha considerado que el nivel de conductas exploratorias puede predecir la respuesta de los roedores a las drogas de abuso (Kabbaj, 2006; Vidal-Infer y cols., 2012). La preferencia por la novedad ha sido relacionada con una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de la Anfetamina (Piazza y cols., 1989; Dellu y cols., 1996; Klebaur y Bardo, 1999; Klebaur y cols., 2001), la morfina (Zheng y cols., 2003; Nadal y cols., 2005; Pelloux y cols., 2006), la cocaína (Belin y cols., 2008, 2011; Davis y cols., 2008; Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014) o la comida (Dellu y cols., 1996). Por el contrario, otros estudios no han encontrado una relación entre el nivel de NS y una mayor sensibilidad a las drogas, como la cocaína (Gong y cols., 1996; Kosten y Miserendino, 1998), la Anfetamina (Erb y Parker, 1994; Kliethermes y cols., 2007) o el alcohol (Kliethermes y cols., 2007).

La prueba del *hole-board*, desarrollada por Boissier y Simon (1962, 1964), constituye una manera sencilla para evaluar la respuesta de los roedores a un ambiente desconocido, contando el número de inmersiones de la cabeza (*head dips*) que realizan en unos agujeros dispuestos en el suelo. Se considera que esta medida refleja la tendencia a la exploración de los ratones, la cual es diferente a la actividad locomotora (Calabrese, 2008), y también se ha utilizado para evaluar la ansiedad en ratones (Calabrese, 2008; Takeda y cols., 1998). El *hole-board* es útil para evaluar el nivel de NS, ya que los animales se

pueden clasificar de acuerdo a su propensión a explorar los agujeros (por el número de *head dips*) como HNS o LNS (Abreu Villaça y cols., 2006; Kliethermes y Crabbe, 2006). En un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio, se advirtió una mayor capacidad predictiva de la prueba del *hole-board* para identificar a los ratones adolescentes que presentan una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas (Arenas y cols., 2014). Teniendo en cuenta que el período de la adolescencia se asocia con un aumento de la motivación para buscar nuevos estímulos, y que este rasgo de comportamiento, el NS, puede estar asociado con el abuso de sustancias, resulta llamativo que ningún estudio haya evaluado cómo el nivel de NS influye en los efectos de la exposición temprana a la cocaína.

Por lo tanto, el presente estudio fue diseñado para evaluar los efectos a largo plazo de un tratamiento intensivo de cocaína durante la adolescencia en ratones clasificados como altos o bajos buscadores de la novedad, asumiendo que el nivel de NS puede ser un predictor de la vulnerabilidad a la aparición de problemas relacionados con las drogas. Con este propósito, los ratones adolescentes realizaron el test del *hole-board* con el fin de clasificarlos como HNS o LNS. Después, recibieron un tratamiento intensivo en forma de *binge* de cocaína y, tres semanas después del final de dicho tratamiento (una vez ya han alcanzado la adultez), se evaluó su conducta espontánea e inducida por drogas. En el experimento 1, los efectos a largo plazo de un *binge*

## **Estudio 1**

de cocaína en ratones HNS y LNS fueron evaluados en modelos de NS (actividad motora espontánea y test de *hole-board*), la ansiedad (laberinto elevado en cruz, LEC) y la interacción social (encuentro agonístico con un co-específico). En el experimento 2, los efectos a largo plazo de un *binge* de cocaína sobre los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA en ratones HNS y LNS mediante el paradigma del CPL. Así mismo, se realizó un experimento adicional en el que ratones adultos fueron sometidos a los mismos procedimientos experimentales que los adolescentes en el experimento 2 con el fin de controlar el efecto de la edad en el momento de la exposición a la cocaína. Por lo tanto, hipotetizamos que los animales expuestos a la cocaína durante la adolescencia mostrarán alteraciones en su comportamiento espontáneo durante la adultez, y serán más sensibles a los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA, especialmente los animales HNS.

### **7.1.2. Material y métodos**

#### **7.1.2.1. Sujetos experimentales**

Un total de 257 ratones machos de la cepa no consanguínea OF1 se adquirieron comercialmente en Charles River (Barcelona, España). Los

animales adolescentes (n=177) llegaron al laboratorio con 21 días de edad (*postnatal day*, PND) y los adultos (n=80) con 49 días; fueron alojados en grupos de cuatro en jaulas de plástico (28 cm largo x 28 cm de ancho x 14.5 cm de altura) dejando pasar entre 10-12 días como período de habituación antes de iniciar los experimentos, bajo las siguientes condiciones: temperatura constante ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), horario de luz invertida (luz blanca: 20.00-08.00 h), y comida y agua disponible *ad libitum* (excepto durante las pruebas conductuales). No se detectaron diferencias entre el peso de los animales tratados con la cocaína y los tratados con solución salina ( $p > 0.05$ ). Los procedimientos con los ratones y su cuidado se llevaron a cabo en conformidad con las leyes y regulaciones nacionales, regionales y locales, siguiendo la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos.

#### **7.1.2.2. Tratamiento farmacológico**

El clorhidrato de cocaína (Laboratorios Alcaliber, España) y el clorhidrato  $\pm$  3,4 methylenedioxyamfetamina (MDMA, Agencia Española del Medicamento, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, Madrid, España) se diluyeron en suero fisiológico a un volumen constante (0.01 ml/g) y se administraron vía intraperitoneal

## **Estudio 1**

(i.p.). El pre-tratamiento intensivo en forma de *binge* consistió en tres inyecciones diarias administradas en intervalos de 1 hora entre los 34 y 45 PND (en el grupo de adolescentes) o 61 y 72 PND (en el grupo de adultos) con aumento gradual de la dosis en diferentes puntos durante un periodo de tratamiento de 12 días. Los 34 y 35 PND, los ratones recibieron 5 mg/kg de cocaína, desde el 36 al 38 PND recibieron 15 mg/kg y del 41 al 45 PND recibieron 25 mg/kg (experimento 1). Este protocolo de administración fue extraído y adaptado de Sullivan y cols., (2011), y ha demostrado inducir alteraciones duraderas en el comportamiento de los roedores (Black y cols., 2006; Sullivan y cols., 2011). Basándonos en estudios anteriores, donde el tratamiento previo con dosis elevadas de cocaína disminuye los efectos reforzantes de esta droga (Manzanedo y cols., 2012), los ratones que iban a ser condicionados con cocaína o MDMA (experimento 2) recibieron un pre-tratamiento con dosis más bajas de cocaína siguiendo el mismo esquema de administración con 5, 10 y 15 mg/kg. Este pre-tratamiento se inició el 34 ó 35 PND en los grupos de adolescentes y el 61 ó 62 PND en los grupos de adultos (véase la Tabla 1B). A los grupos controles se les administró inyecciones de solución salina en ambos experimentos. Las dosis de MDMA y cocaína utilizadas para inducir CPL (1.25 y 1 mg/kg, respectivamente) fueron seleccionadas teniendo en cuenta estudios previos en los que se demostró que estas dosis eran subumbrales (Daza-Losada y cols., 2009; Manzanedo y cols., 2010; Vidal-Infer y cols., 2012).



### **7.1.3 Aparatos y procedimiento**

#### **7.1.3.1. Test *hole-board***

Este test se realiza en una caja cuadrada (28 x 28 x 20,5 cm) con paredes transparentes de plexiglás y 16 agujeros equidistantes en su suelo de 3 cm de diámetro (CIBERTEC SA, España). Las fotocélulas halladas bajo la superficie de los agujeros detectan el número de veces que el ratón los explora, registrando el número de veces que mete la cabeza en ellos (*head-dip*). Al comienzo de la prueba, los ratones fueron colocados en una esquina concreta de la caja, permitiéndoles explorar libremente el aparato durante 10 minutos. La frecuencia de *head-dips* realizados se registró automáticamente por el aparato. Cuatro tubos de neón fijos en el techo (intensidad de luz de 110 lux a 50 cm sobre el nivel del suelo) iluminaban la sala experimental. Antes del pre-tratamiento de cocaína, los animales se definieron como altos y bajos buscadores de la novedad de acuerdo al número de *head-dips* (por debajo o por encima de la mediana del grupo) cuando contaban con 33 PND (los ratones adolescentes) o 60 PND (los ratones adultos).

## ***Estudio 1***

### **7.1.3.2. Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC)**

El aparato utilizado para esta prueba consiste en dos brazos abiertos (30 x 5 x 0,25 cm) y dos brazos cerrados (30 x 5 x 15 cm) con una plataforma central (5 x 5 cm) en la unión de los cuatro brazos. El suelo del laberinto es de plexiglás negro y las paredes de los brazos cerrados de plexiglás transparente. Los brazos abiertos tienen un borde pequeño (0,25 cm) para proporcionar un agarre adicional a los animales. Toda la estructura está elevada 45 cm sobre el nivel del suelo. Los ratones fueron transportados 1 hora antes de la prueba a la sala experimental débilmente iluminada. Al comienzo de cada ensayo, los sujetos fueron colocados en la plataforma central de cara a un brazo abierto, y se les permitió explorar libremente durante 5 minutos. El laberinto se limpió con alcohol 7% después de cada prueba, y no se realizó la siguiente prueba hasta que no se encontraba completamente seco. El comportamiento de los ratones fue grabado con una cámara de vídeo y posteriormente analizado por un investigador ciego a las condiciones experimentales, utilizando un programa informático llamado Raton Time 1,0 (Fixma, SL, Valencia, España). Las medidas registradas fueron la frecuencia de las entradas y el tiempo de permanencia en cada sección del aparato (los brazos abiertos, los brazos cerrados, y la plataforma central). Se considera que el animal ha entrado en un brazo cuando ha colocado las cuatro patas sobre él. El tiempo de latencia para entrar por primera vez a los

brazos abiertos, el porcentaje de tiempo empleado en los brazos abiertos, el número de entradas en los brazos cerrados y el porcentaje de entradas en los brazos abiertos  $[(abierto+cerrado) \times 100]$ , son las medidas que generalmente se analizan en esta prueba (Rodgers y Johnson, 1995; Rodgers y Dalvi, 1997).

### **7.1.3.3. Actividad motora espontánea**

La actividad motora espontánea de los ratones fue registrada automáticamente por ocho actímetros (Cibertec SA, España), cada uno de los cuales consiste en una caja (33x15x13 cm) con ocho haces de infrarrojos situados en un marco alrededor de la misma a 1.6 cm por encima del suelo (coincidiendo con la altura del cuerpo de los ratones). Los actímetros se colocaron separados unos de otros por 4 cm, y como los marcos son negros, los animales no se veían entre sí. La habitación experimental se iluminó con una luz tenue (22 W, 1080 lm) y la actividad motora espontánea sin adaptación previa al actímetro se registró en un ordenador cada 10 min durante 1 h. El aparato fue limpiado con agua entre los sujetos.

## ***Estudio 1***

### **7.1.3.4. Prueba de interacción social**

Esta prueba consistió en enfrentar a un animal experimental con un oponente estándar en una jaula neutral (61 × 30,5 × 36 cm) durante 10 minutos después de un periodo de adaptación de 1 minuto antes del encuentro. Los oponentes estándares fueron temporalmente anosmiados por un lavado nasal con una solución de sulfato de zinc 4%, 1 día antes de la prueba (Smoothy y cols., 1986). Este ratón anosmiado puede producir con su presencia una reacción de ataque en su oponente, el ratón experimental; sin embargo, el ratón anosmiado no interactúa con el experimental, ya que no puede percibir las feromonas en la orina de otros animales las cuales suelen ser la señal para que los ratones con un sentido del olfato normal activen un comportamiento agresivo. De esta manera, podemos evaluar la conducta social del ratón experimental sin la interacción del control o anosmiado (Brain, 1981; Mugford y Nowell, 1970). El encuentro se registró en vídeo en una sala experimental con iluminación blanca, y posteriormente fueron analizados mediante un programa desarrollado para tal fin (Raton Time 1,0, Fixma, SL, Valencia, España) que estima el tiempo dedicado a las diferentes categorías funcionales de la conducta (la excavación, la exploración no social, la exploración a distancia, la investigación social, la amenaza y el ataque), cada uno de los cuales se caracteriza por una serie de

diferentes posturas y elementos. Una descripción más detallada de las mismas se puede encontrar en Rodríguez-Arias y cols. (1998).

#### **7.1.3.5. Condicionamiento de preferencia de lugar (CPL)**

Se emplearon doce cajas de plexiglás con dos compartimentos de igual tamaño (30,7 cm x 31,5 cm de longitud ancho x 34.5 cm de altura) separados por una zona central gris (13,8 cm x 31,5 cm de longitud ancho x 34.5 cm de altura). Los compartimentos tienen diferente color (negro vs. blanco) y texturas de suelo (suelo liso en el compartimento negro vs. suelo rugoso en el blanco). Cuatro haces de infrarrojos en cada compartimento de la caja y seis en la zona central registran automáticamente la posición del animal y sus cruces de un compartimento a otro. Tres ordenadores IBM controlaban el equipo utilizando el software MONPRE 2Z (CIBERTEC SA, España).

El experimentador manipulaba brevemente a los animales durante los 3 días anteriores al inicio del CPL, el cual consistió en tres fases que tuvieron lugar durante el ciclo de oscuridad. En la primera fase, se les permitía a los animales el libre acceso a ambos compartimentos del aparato durante 15 minutos (900 segundos) cada día, durante 3 días consecutivos. Solo se registró el tiempo de permanencia del animal en

## ***Estudio 1***

cada compartimento durante el tercer día. En cada grupo, la mitad de los animales recibieron la droga o vehículo en un compartimento (p.e. negro), y la otra mitad en el otro compartimento (p.e. blanco). Después de asignar los compartimentos, se comprobó mediante un análisis de varianza que no hubiesen diferencias significativas entre el tiempo pasado en el compartimento que se iba a asociar con la droga y el otro compartimento durante la fase de pre-condicionado (Pre-C). En la segunda fase (condicionamiento), los animales fueron condicionados con MDMA o cocaína, a través de cuatro emparejamientos con el compartimento asociado. Los animales que fueron condicionados con MDMA se sometieron a un único emparejamiento por día, consistiendo en una inyección de MDMA (1,25 mg/kg) inmediatamente antes de ser confinado en el compartimento asociado con la droga durante 30 minutos en los días 4, 6, 8 y 10; y solución salina antes de ser confinado en el compartimento no asociado a la droga durante 30 minutos en los días 5, 7, 9 y 11. Los animales controles recibieron una inyección de solución salina antes de ser confinados durante 30 minutos a cualquiera de los compartimentos en los días 4, 6, 8 y 10, y al otro en los días 5, 7, 9 y 11. Los animales tratados con cocaína se sometieron a dos emparejamientos por día en los días 4, 5, 6 y 7, recibiendo una inyección de solución salina inmediatamente antes de ser confinado en el compartimento no asociado a la droga 30 min, y recibiendo, después de un intervalo de 4 h, una inyección de cocaína (1 mg/kg)

inmediatamente antes del confinamiento en el compartimento asociado a la droga durante 30 min. La zona central se hizo inaccesible durante la fase de condicionamiento. Durante la tercera fase, o post-condicionado (Post-C), que tuvo lugar el día 12 (cuando se empleó MDMA) o el día 8 (cuando se empleó cocaína), las puertas que separan los dos compartimentos se retiraron y el tiempo dedicado a cada compartimento durante un período de 900 segundos fue registrado. La diferencia en segundos entre el tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga en la medición realizada durante el Post-C y el empleado en el mismo compartimento durante el Pre-C se considera que es una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga. Si esta diferencia es positiva, entonces el fármaco ha inducido una preferencia hacia el compartimento asociado a la droga, mientras que lo contrario indica el desarrollo de una aversión.

Los grupos condicionados fueron sometidos a dos sesiones de extinción semanales que consistieron en colocar los animales en el aparato (sin las puertas que separan los compartimentos entre sí) durante 15 minutos. El criterio de extinción se cumplió cuando dejó de haber diferencias significativas entre las puntuaciones de condicionamiento y los valores de la prueba Pre-C en dos sesiones consecutivas. Por lo tanto, todos los animales de cada grupo fueron sometidos a la misma cantidad de sesiones de extinción

## **Estudio 1**

independientemente de sus resultados individuales. Los grupos no condicionados fueron sometidos solamente a una sesión de extinción para confirmar la ausencia de CPL.

Los efectos de una dosis *priming* (MDMA o cocaína) fueron evaluados 24 horas después de haberse confirmado la extinción. La prueba fue la misma que las realizadas durante el Post-C (deambulación libre durante 15 minutos), excepto que los animales realizaron el test 15 minutos después de la administración de una dosis *priming* del fármaco empleado durante el acondicionamiento (la mitad de la dosis utilizada para inducir CPL).

### **7.1.4. Diseño experimental**

En la tabla 1 podemos observar un cuadro resumen con todo el diseño experimental. En todos los experimentos, los animales realizaron en primer lugar el test del *hole-board* (el PND 33 en el caso de los adolescentes y el PND 60 en el de los adultos) y fueron considerados altos buscadores de la novedad (HNS) o bajos buscadores de la novedad (LNS) en función de si el número de *dips* realizado por el sujeto estaba por encima o por debajo de la mediana del grupo. En el experimento 1, los animales recibieron el tratamiento de cocaína o de



solución salina durante la adolescencia (PND 34-45), y se llevaron a cabo las pruebas conductuales cuando ya habían entrado en la edad adulta (a partir del PND 67). De esta manera, los animales fueron asignados a los siguientes grupos de tratamiento: HNS cocaína (n=17), LNS cocaína (n=20), HNS solución salina (n=14) y LNS solución salina (n=13). Tres semanas después del tratamiento, los animales realizaron las pruebas conductuales del LEC, la actividad motora espontánea, el test hole-board y el test de interacción social (véase la tabla 1A). En el experimento 2, cuatro grupos de ratones fueron condicionados con MDMA o cocaína tres semanas después del tratamiento. En el primer grupo, los animales adolescentes se dividieron en los siguientes grupos: HNS cocaína (n=14), LNS cocaína (n=14), solución salina HNS (n=14) y LNS salinos (n=14). Tres semanas después, fueron condicionados con MDMA. En el segundo grupo, los ratones adolescentes fueron asignados a los siguientes grupos: HNS cocaína (n=15), LNS cocaína (n=14), solución salina HNS (n=14) y LNS salinos (n=14). Tres semanas después fueron condicionados con cocaína. Los grupos restantes de ratones adultos recibieron el pre-tratamiento con cocaína o solución salina (PND 61-72) y se sometieron a las pruebas del CPL tres semanas más tarde (PND 93). En el tercer grupo, los ratones adultos fueron divididos en cuatro grupos - cocaína HNS (n=11), LNS cocaína (n=9), solución salina HNS (n=12) y el LNS salinos (n=9), y luego condicionados con MDMA. En el cuarto grupo, los ratones adultos fueron divididos en uno de los siguientes grupos - cocaína HNS (n=10),

## **Estudio 1**

LNS cocaína (n=11), HNS solución salina (n=10) y LNS solución salina (n=8), y tres semanas después fueron condicionados con cocaína (véase la Figura 1B). Pruebas t de Student mostraron diferencias significativas entre el número de head-dips realizados por los grupos HNS y LNS ( $p < 0.01$ ).

### **7.1.5. Análisis estadísticos**

Se realizó un ANOVA para cada medida en el LEC, la actividad motora espontánea y la prueba de la interacción social, con dos variables entre: búsqueda de la novedad (NS), con dos niveles (HNS y LNS) y pre-tratamiento, con dos niveles (salino y cocaína). Se realizó un ANOVA adicional para analizar la actividad motora espontánea con dos variables entre: búsqueda de la novedad, con dos niveles (HNS y LNS) y pre-tratamiento, con dos niveles (salino y cocaína), y una variable intra: Tiempo, con seis niveles (los seis períodos de 10 minutos en los que la hora fue dividida para su análisis). Para analizar el test del *hole-board* y el CPL, un ANOVA se realizó con el fin de comparar medidas repetidas con dos variables entre: búsqueda de la novedad, con dos niveles (HNS y LNS) y pre-tratamiento, con dos niveles (salino y cocaína), y una variable intra: Días, con dos niveles (pre y post). En los grupos que presentaron CPP un ANOVA adicional fue realizado, con una variable intra - Días, con cuatro niveles (Pre, Post, Extinción y

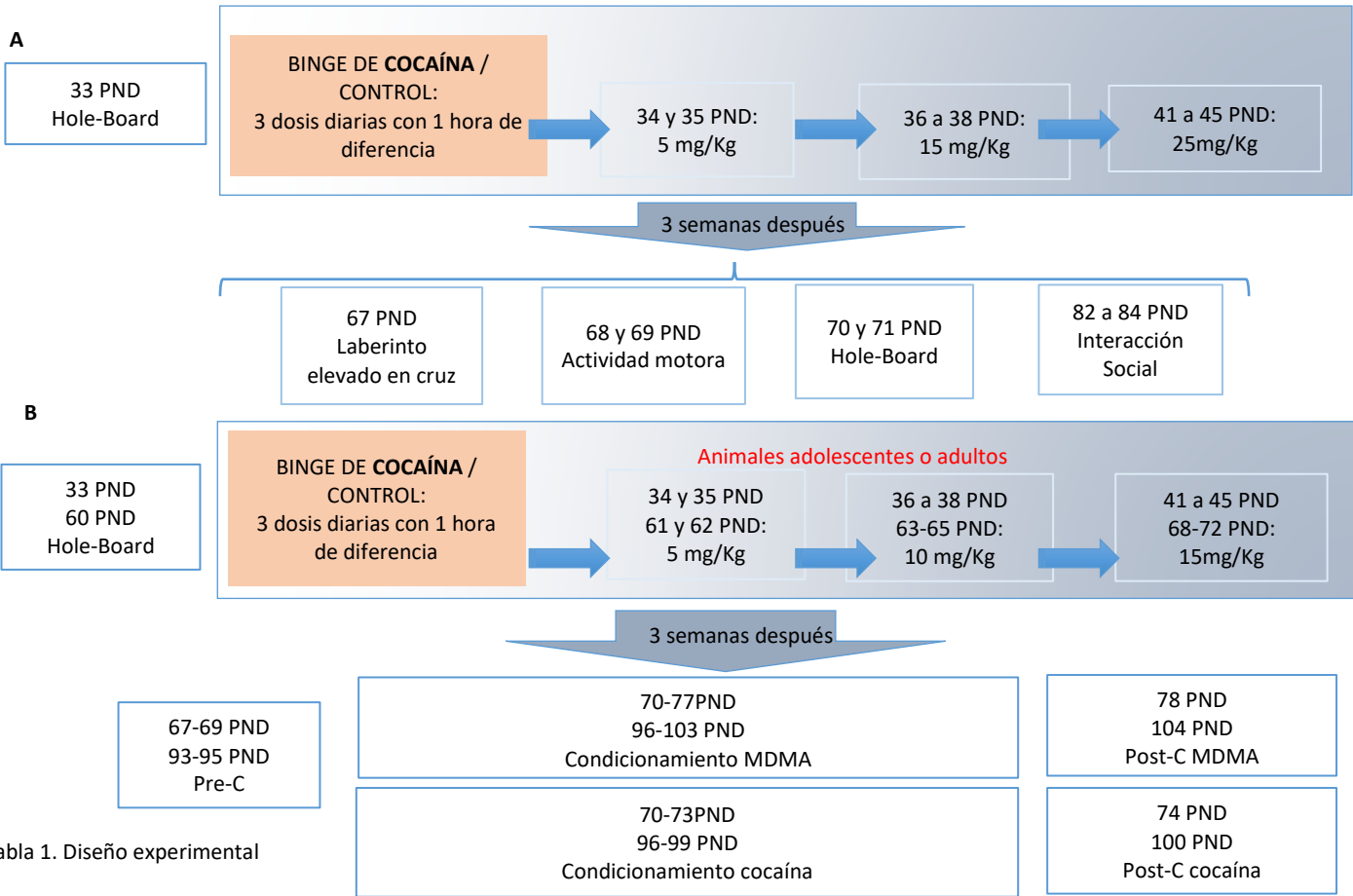


Tabla 1. Diseño experimental

## **Estudio 1**

Reinstauración). Las comparaciones post-hoc fueron realizadas con el test de Bonferroni.

### **7.1.6. Resultados**

#### **7.1.6.1. Test de *hole-board***

Los resultados de la prueba del *hole-board* se presentan en la Figura 2. El ANOVA reveló un efecto significativo de la variable pre-tratamiento [F(1,67)=34.255; p<0.0001] y de la variable búsqueda de la novedad [F(1,67)=107.427; p<0.0001]. Las interacciones días x búsqueda de la novedad [F(1,67)=7.187; p<0.009], Días x pre-tratamiento [F(1,67)=18.473; p<0.0001], búsqueda de la novedad x pre-tratamiento [F(1,67)=7.472; p<0.008] y Días x búsqueda de la novedad x pre-tratamiento [F(1,67)=5,461; p<0.022] también fueron significativas.

En la edad adulta, tanto los animales HNS (p <0,0001) y LNS (p <0,009) que habían sido tratados con cocaína durante la adolescencia realizaron un menor número de *head-dips* que los tratados con solución salina. Los adultos HNS tratados con cocaína realizaron un menor número *head-dips* después de dicho pre-tratamiento

( $p < 0,001$ ), mientras que los tratados con suero fisiológico no mostraron ningún cambio en esta medida ( $p = 0,104$ ).

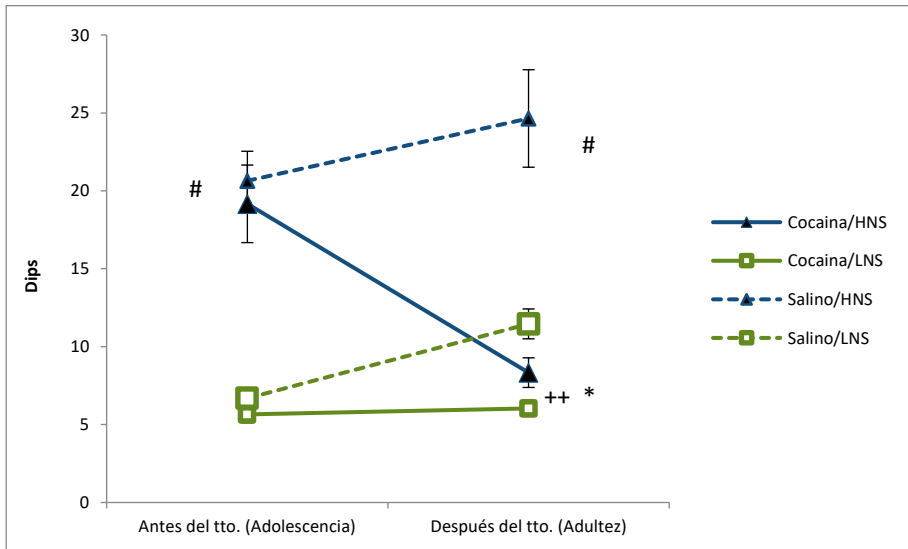


Figura 2. Efecto del binge de cocaína durante la adolescencia sobre la conducta de búsqueda de la novedad de los ratones adultos de acuerdo al número de head-dips realizados en el test hole-board. # $p < 0.001$  HNS vs LNS; ++ $p < 0.001$  cocaína vs salino; \* $p < 0.001$  Cocaína/HNS después del tratamiento vs. Antes del tratamiento.

Por el contrario, los adultos LNS pre-tratados durante la adolescencia con cocaína ( $p = 0,830$ ) o solución salina ( $p = 0,063$ ) no mostraron diferencias entre antes y después del tratamiento. Por lo tanto, el pre-tratamiento con cocaína durante la adolescencia redujo el número de *head-dips* solo en ratones HNS.

## **Estudio 1**

### **7.1.6.2 Test del laberinto elevado en cruz**

Los resultados del laberinto elevado en cruz se presentan en la Tabla 1. El ANOVA realizado para analizar los datos de latencia de entrada en los brazos abiertos revelaron un efecto significativo de la variable pre-tratamiento [ $F(1,40)=6.340$ ;  $p<0.016$ ], la variable búsqueda de la novedad [ $F(1,40) = 4.918$ ;  $p<0.032$ ], y la interacción pre-tratamiento x búsqueda de la novedad [ $F(1,40)=4.291$ ;  $p<0.045$ ]. En los grupos tratados con solución salina, los animales LNS mostraron una mayor latencia de entrada en los brazos abiertos que los ratones HNS ( $p<0.007$ ). Por otra parte, esta latencia fue más corta entre los ratones LNS expuestos a la cocaína que entre los ratones LNS expuestos a la solución salina; por lo tanto, las diferencias observadas entre los animales HNS y LNS en el grupo control, desaparecieron en los animales pre-tratados con cocaína. No se observaron otros efectos significativos.

### **7.1.6.3. Actividad locomotora espontánea**

Los resultados de la actividad motora espontánea se presentan en la Figura 3. El ANOVA realizado de los datos obtenidos durante todo el período (60 min) revelaron un efecto de la variable pre-tratamiento [ $F(1,60)=11,597$ ;  $p <0.001$ ], mostrando los animales pre-tratados con

cocaína más activos que los controles. No se observó ningún efecto significativo de la variable búsqueda de la novedad.

	HNS		LNS	
LEC	Pre-tratados salino	Pre-tratados cocaína	Pre-tratados salino	Pre-tratados cocaína
Latencia de entrada en BA	11±4.7	1.9±0.4	98.6±44.3	4.9±1.8**
Tiempo BA	32.5±9.3	35.5±8.5	41.5±12.6	47.7±7.1
% tiempo en BA	19.6±4.5	20.5±4.1	24.3±7.4	27.8±4
Entradas en BC	16.4±0.8	18.5±1.5	15±1.1	16±1.2
% Entradas en BA	16.8±2.6	22.5±3.3	20.6±5.9	25.9±3.3

Tabla 1. Efectos a largo plazo de la administración intensiva de cocaína durante la adolescencia en ratones adultos altos y bajos buscadores de la novedad en la prueba del LEC (media ± SEM). \*\*p<0.01 vs. pre-tratados con salino LNS.

## **Estudio 1**

El análisis de la actividad motora espontánea en períodos de 10 minutos también reveló un efecto significativo de la interacción pre-tratamiento x tiempo [ $F(5,300)=3.319$ ;  $p<0.006$ ], mostrando los grupos de cocaína más actividad que los grupos salinos en todos los periodos excepto en el último ( $ps<0.01$ ). Además, los animales pre-tratados con solución salina habituaron más rápidamente que los tratados con cocaína, ya que los animales tratados con cocaína fueron más activos durante los primeros 20 minutos que en los períodos de tiempo posteriores ( $p<0.001$ ), mientras que los animales tratados con solución salina fueron inicialmente más activos, pero sólo durante el primer período de 10 minutos ( $p<0.001$ ).

### **7.1.6.4. Test de interacción social**

Los datos de los comportamientos evaluados en la prueba de interacción social se presentan en la Tabla 2. El ANOVA reveló un efecto del tratamiento previo en la latencia de la conducta de exploración social [ $F(1,54) = 4.436$ ;  $p<0.05$ ], los ratones tratados con cocaína muestran latencias más bajas que sus homólogos tratados con solución salina. Sin embargo, la variable pre-tratamiento no tuvo ningún efecto sobre el tiempo dedicado a la exploración social.



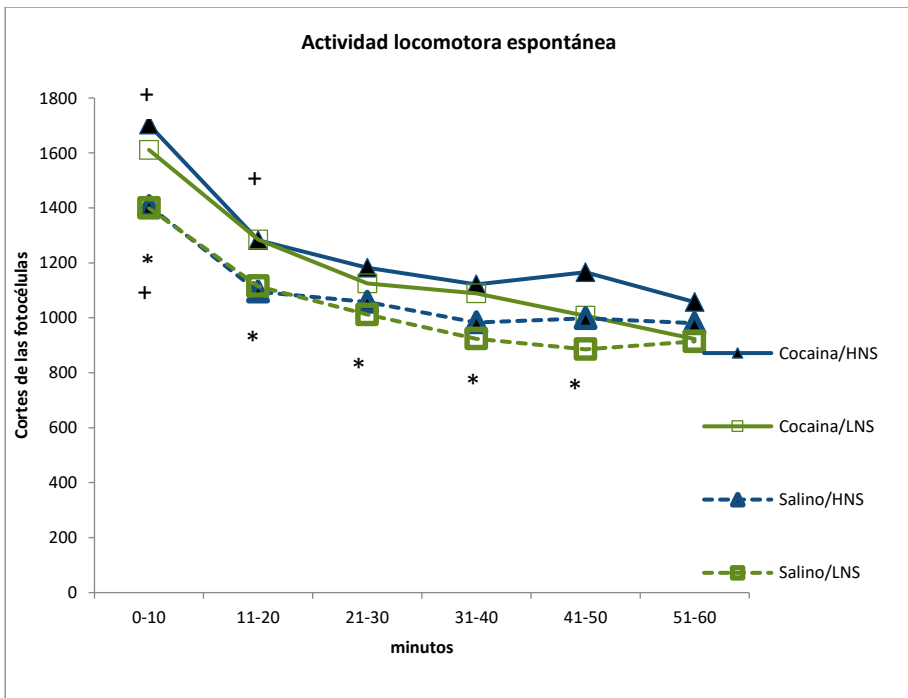


Figura 3. Efectos a largo plazo de la administración intensiva de cocaína durante la adolescencia en ratones adultos altos y bajos buscadores de la novedad en la prueba del LEC sobre la actividad locomotora espontánea \* $p < 0.01$  vs. pretratados con cocaína; + $p < 0.001$  vs. otros intervalos temporales.

El ANOVA reveló también un efecto de la variable búsqueda de la novedad en diferentes comportamientos, incluyendo la exploración no social [ $F(1,54)=5.940$ ;  $p < 0.05$ ], la exploración social [ $F(1,54)=8.069$ ;  $p < 0.01$ ], y la latencia de la conducta de exploración social [ $F(1,54)=6.916$ ;  $p < 0.05$ ]. Los ratones HNS dedicaron más tiempo a la

## Estudio 1

exploración no social y menos tiempo a la investigación social y mostraron una latencia más corta para iniciar este comportamiento, en comparación con sus homólogos LNS.

	HNS		LNS	
Interacción social	Pre-tratados salino	Pre-tratados cocaína	Pre-tratados salino	Pre-tratados cocaína
Escarbar	20.2 ± 2.9	18.9 ± 3.3	12.9±2	20.9±2.8
Exploración no social	455 ± 15	436 ± 13	420±15	408±10
Exploración a distancia	25.7 ± 2.4	29.5 ± 3.9	32.3±3.3	27.5±1.9
Exploración social	69.5 ± 8.7	70.3 ± 6.8	88.8±11.3	99.4±7.2
Latencia de exploración social	9.2 ± 1.5	4.4 ± 0.8	15.9±4	10.3±1.9
Amenaza	12 ± 6.4	21.2 ± 12.5	27±11.4	15.8±7.1
Ataque	4.5 ± 2.2	10 ± 4.5	8.1±4.2	6.5±2.9

Tabla 2. Tiempos invertidos en diferentes categorías de comportamiento espontáneo durante la prueba de la interacción social en ratones adultos HNS y LNS tratados durante la adolescencia con la cocaína o solución salina. Media de los tiempos acumulados (en segundos) ± SEM. \* El ANOVA revela efecto del pretratamiento sobre la latencia de exploración social, presentando una menor latencia los ratones pretratados con cocaína frente a los pretatados con salino.

### **7.1.6.5. Condicionamiento de preferencia de lugar**

#### **7.1.6.5.1. CPL inducido con MDMA**

Los resultados del CPL inducido con MDMA se presentan en la Figura 4. El ANOVA para el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante el pre y post-condicionamiento por los ratones pre-tratados durante la adolescencia con cocaína reveló un efecto de la variable días [ $F(1,37)=7.683$ ;  $p<0.01$ ]. La interacción días x NS x pre-tratamiento también resultó significativa [ $F(1,37)=4.575$ ;  $p<0.05$ ]. Sólo los animales HNS tratados con cocaína durante la adolescencia pasaron más tiempo en el compartimento asociado a la droga en la fase de Post-C en comparación al Pre-C ( $p < 0.01$ ). Por otra parte, hubo una diferencia significativa en el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga en el Post-C entre los grupos tratados con cocaína durante la adolescencia, siendo los ratones HNS los que pasaron más tiempo en este compartimento en comparación a los animales LNS ( $p<0.05$ ). El único grupo que mostró CPL inducido por MDMA fueron los ratones HNS tratados con cocaína durante la adolescencia (Fig. 4a). El ANOVA realizado para analizar los datos de los animales HNS tratados con cocaína durante la adolescencia, mostró un efecto de las variables días [ $F(3,7)=4.223$ ;  $p<0.05$ ], observándose diferencias significativas entre Pre-C y Post-C ( $p<0.05$ ),

## Estudio 1

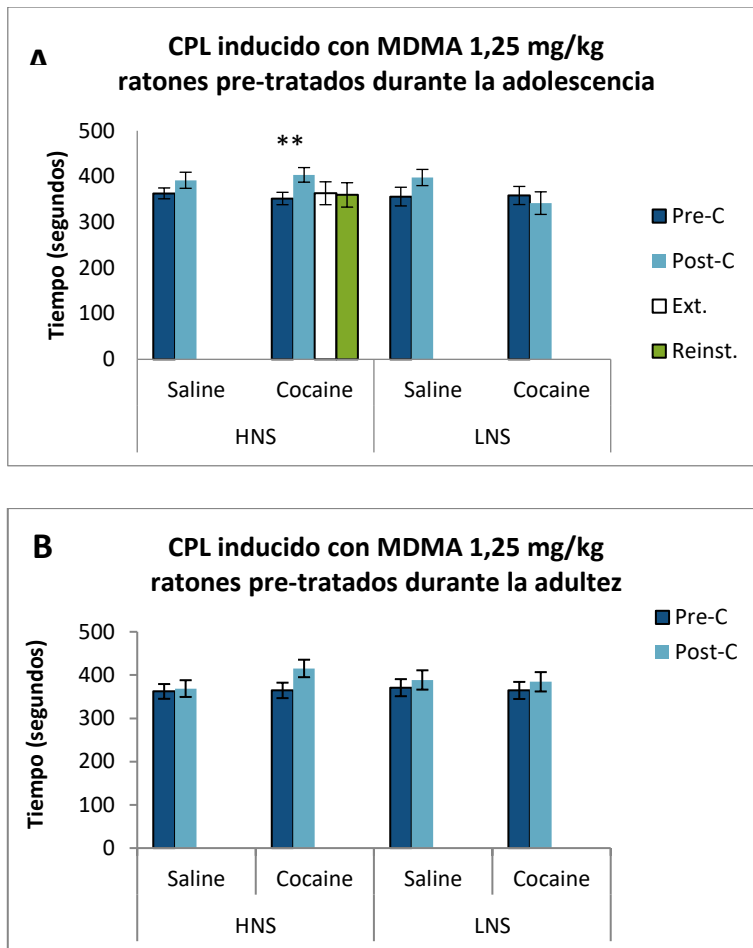


Figura 4. CPL inducido por 1,25 mg/kg de MDMA en ratones adultos altos y bajos buscadores de la novedad tratados tres semanas antes, durante la adolescencia (a) o durante la adultez (b), con cocaína o solución salina. Las barras representan el tiempo en segundos transcurridos en el compartimento asociado a la droga durante el Pre-C (azul oscuro), Post-C (azul claro), la última sesión de extinción (blanco) y reinstauración (verde). Los valores son la media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  Pre-C vs. Post-C.

pero no entre Pre-C y Extinción o Reinstauración.

El ANOVA para el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante el pre y post-condicionamiento de los ratones pre-tratados con cocaína durante la edad adulta no mostró ningún efecto significativo (Fig. 4b).

#### **7.1.6.5.2 CPL inducido con cocaína**

Los resultados obtenidos para el CPL inducido por cocaína se presentan en la Figura 5. El ANOVA para el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante el Pre-C y Post-C de los ratones pre-tratados con cocaína durante la adolescencia reveló un efecto de la variable días [ $F(1,38)=12.926$ ;  $p<0.001$ ]. Las interacciones días x NS [ $F(1,38)=6.232$ ;  $p<0.05$ ] y días x NS x pre-tratamiento [ $F(1,38)=4.144$ ;  $p<0.05$ ] también fueron significativas. Los grupos HNS pasaron más tiempo en el compartimento emparejado con la droga en el Post-C que en el Pre-C ( $p<0.001$ ), aunque sólo pasaron más tiempo en el compartimento emparejado con la droga en Post-C que en Pre-C los animales HNS pre-tratados con cocaína ( $p<0.01$ ). Por otra parte, los ratones HNS pre-tratados con cocaína pasaron más tiempo en el compartimento asociado a la droga en el Post-C que los ratones LNS

## Estudio 1

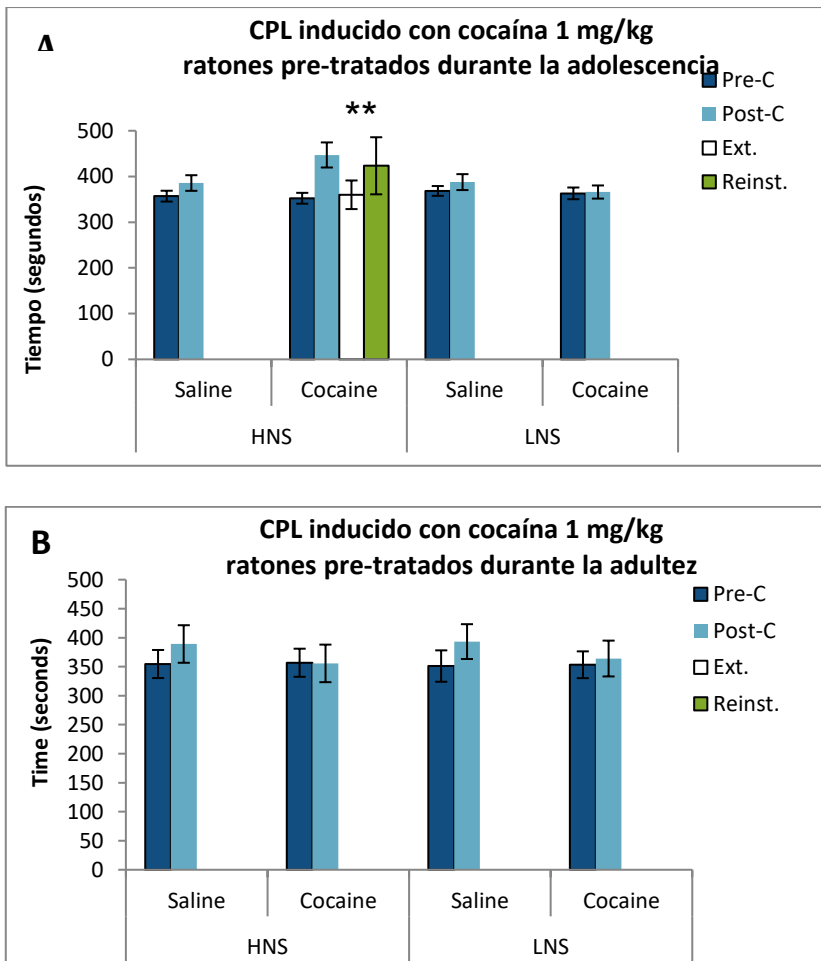


Figura 5. CPL inducido con cocaína 1 mg/kg en ratones adultos altos y bajos buscadores de la novedad tratados tres semanas antes, durante la adolescencia (a) o la edad adulta (b), con cocaína o solución salina. Las barras representan el tiempo en segundos transcurridos en el compartimento asociado a la droga durante el Pre-C (azul oscuro), Post-C (azul claro), la última sesión de extinción (blanco) y reinstauración (verde). Los valores son la media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  Pre-C vs. Post-C.

pre-tratados con cocaína ( $p < 0.01$ ) y los ratones tratados con solución salina HNS ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que el único grupo que adquirió CPL inducido por cocaína fue el grupo de ratones HNS tratados con esta droga durante la adolescencia (Fig. 5a).

El ANOVA realizado con los datos de los animales HNS tratados con cocaína durante la adolescencia reveló un efecto de las variables días [ $F(3,7) = 5.209$ ;  $p < 0.05$ ], con diferencias significativas entre Pre-C y Post-C ( $p < 0.05$ ), pero no entre Pre-C y Extinción o Reinstauración.

El ANOVA realizado con el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante el pre y post-condicionado por los ratones pre-tratados con cocaína durante la edad adulta no mostró ningún efecto significativo [ $F(1,35) < 3,3$ ] (Fig. 5b).

### **7.1.7. Discusión**

El principal objetivo de este estudio fue evaluar los efectos a largo plazo de la administración intensiva tipo *binge* de cocaína durante la adolescencia o en la edad adulta de acuerdo al rasgo de búsqueda de la novedad. Para este propósito, los animales fueron diferenciados

## **Estudio 1**

como altos o bajos buscadores de la novedad, y a continuación recibieron un *binge* de cocaína bien durante los PND 34-45 (adolescentes) o bien durante los PND 61-72 (adultos). Posteriormente, se realizaron diferentes pruebas de comportamiento durante la edad adulta (PND>68). Nuestros resultados muestran, por primera vez en la literatura, que la administración repetida de cocaína durante la adolescencia altera la sensibilidad a los efectos reforzantes de dosis bajas de cocaína y MDMA sólo en los animales HNS durante la edad adulta, sin inducir otros cambios importantes en su conducta.

El inicio del consumo de drogas se produce en la adolescencia en mayor medida que en otras etapas de la vida (Casey y Jones, 2010; Spear, 2011), probablemente debido a que la toma de decisiones durante este período de desarrollo está modulada principalmente por factores emocionales y sociales, como puede ser la presión ejercida por el grupo de iguales (Blakemore y Robbins, 2012). La adolescencia también se asocia con un aumento en la motivación por buscar nuevos estímulos, y se ha sugerido que los individuos caracterizados como HNS son más propensos a abusar de las drogas que los LNS. Por ejemplo, los ratones HNS (es decir, aquellos que realizaron un mayor número de *head-dips* en el test del *hole-board*) mostraron una mayor preferencia por la nicotina (Abreu Villaça y cols., 2006). Además, hemos observado recientemente que sólo los adolescentes HNS clasificados mediante el test *hole-board* (Arenas y cols., 2014) y los



jóvenes adultos HNS clasificados mediante el test del ambiente novedoso (Vidal-Infer y cols., 2012) presentan una mayor vulnerabilidad a los efectos reforzantes de una dosis subumbral de cocaína en el CPL. En el presente estudio, hemos ampliado dichos resultados mediante la demostración de que el nivel de búsqueda de la novedad también influye en los efectos que una exposición temprana a la cocaína tiene en la posterior vulnerabilidad a las drogas de abuso durante la etapa adulta. Los ratones adolescentes con un fenotipo HNS son particularmente vulnerables a los efectos de un pre-tratamiento de cocaína, dado que aumentan su sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA en el paradigma CPL durante la edad adulta. La edad del animal resultó ser crítica en los efectos observados, ya que el *binge* cocaína no causó tal variación a largo plazo en la sensibilidad de los ratones a los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA en el CPL. Sí fue observada una tendencia a desarrollar CPL inducido por MDMA en los ratones adultos HNS pre-tratados con cocaína, pero no alcanzó la significación estadística.

Como esperábamos, los ratones HNS y LNS pre-tratados con suero fisiológico no mostraron CPL inducido por MDMA o cocaína, ya que la dosis utilizada era subumbral (Daza-Losada y cols., 2009; Maldonado y cols., 2006; Ribeiro Do Couto y cols., 2012). Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que los ratones adolescentes HNS *naïve* adquieren también CPL con una dosis de 1

## ***Estudio 1***

mg/kg de cocaína, la cual resulta ineficaz en los ratones LNS (Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014). Es probable que la edad de los animales en el momento de la realización del paradigma de CPL haya contribuido a las diferencias con los resultados del presente trabajo. En los estudios antes mencionados (Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014), se valoró la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína en ratones adolescentes, mientras que en el presente trabajo, fueron evaluados los ratones cuando ya eran adultos. Es bien sabido que los roedores adolescentes son más sensibles que los adultos a los efectos reforzantes de la cocaína (para ver una revisión: Schramm-Sapota y cols., 2009). Además, de acuerdo con nuestros resultados actuales, se ha visto que, cuando las ratas adultas machos se clasifican como HNS vs. LNS, ningún grupo desarrolla CPL con 2,5 mg / kg de cocaína (Gong y cols., 1996).

Por el contrario, los ratones HNS tratados con cocaína durante la adolescencia desarrollan CPL después del condicionamiento con dosis subumbral de MDMA o cocaína, mientras que los ratones LNS tratados con cocaína durante la adolescencia no adquirieron CPL. Hemos observado anteriormente que el tratamiento previo durante la adolescencia con diferentes drogas de abuso, como la cocaína (Daza-Losada y cols., 2009), la MDMA (Daza-Losada y cols., 2009; Ribeiro Do Couto y cols., 2011, 2012), los cannabinoides (Manzanedo y cols., 2010; Rodríguez-Arias y cols., 2010) o el alcohol (Ribeiro Do Couto y

cols., 2011, 2012), aumenta los efectos gratificantes de la MDMA. Del mismo modo, otros investigadores han demostrado que los roedores adultos previamente tratados con varias dosis de cocaína desarrollan una sensibilización a los efectos reforzantes de esta droga en el paradigma del CPL (Lett, 1989; Shippenberg y Heidbreder, 1995a, 1995b; Shippenberg y cols., 1996, 1998) y la auto-administración (Liu y cols., 2005; Morgan y cols., 2006). Sin embargo, en el presente estudio, un *binge* dosis-creciente de cocaína administrado a ratones adultos no aumentó significativamente los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA cuando los ratones fueron evaluados tiempo después del pre-tratamiento de cocaína. Hasta la fecha, este es el primer estudio que evalúa los efectos a largo plazo de la exposición a la cocaína durante la adolescencia en los subsiguientes efectos reforzantes de esta droga en la edad adulta.

La mayor respuesta a la MDMA y la cocaína en el CPL por parte de los ratones HNS expuestos a la cocaína durante la adolescencia podría estar relacionada con el hecho de que estos animales muestran una respuesta conductual y neuroquímica más fuerte después de la administración del fármaco. Por ejemplo, los ratones HNS presentaron una mayor autoadministración de cocaína (Belin y cols., 2011, Davis y cols., 2008), una mayor sensibilidad al CPL inducido con cocaína (Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014), una mayor respuesta en la actividad motora tras la administración de cocaína (Hooks y cols.,

## **Estudio 1**

1991; Chefer y cols., 2003) y una más pronunciada respuesta de la DA en el NAcc en comparación a los animales LNS (Hooks y cols., 1991; Chefer y cols., 2003). Por otra parte, la exposición a la cocaína durante la adolescencia aumenta la actividad locomotora inducida por esta droga (Black y cols., 2006; Wheeler y cols., 2013) y el CPL inducido por MDMA (Daza-Losada y cols., 2009), y produce cambios funcionales y estructurales en las regiones del cerebro implicadas en la adicción (Ehrlich y cols., 2002; Wheeler y cols., 2013). Estas respuestas, que han sido observadas por separado en animales HNS y pre-tratados con cocaína, pueden interaccionar para producir una mayor vulnerabilidad a la respuesta a la droga en ratones HNS expuestos a la cocaína durante la adolescencia.

Una administración tipo *binge* de cocaína durante la adolescencia también produjo cambios, aunque leves, en el comportamiento de los ratones en la edad adulta, especialmente en los animales HNS. Dichos cambios pueden estar relacionados con la mayor vulnerabilidad a los efectos reforzantes de la cocaína y MDMA. Una disminución en la preferencia por la novedad en los ratones adultos con respecto a los controles, especialmente en el caso de los animales HNS, fue uno de los cambios de conducta observados. De esta manera, los ratones controles mantuvieron las diferencias en el número de *head-dips* entre HNS versus LNS cuando volvieron a ser evaluados en la edad adulta, mientras que en los animales tratados con cocaína estas diferencias

desaparecieron. Este efecto no parece haber sido debido a una disminución en la actividad, ya que estos animales mostraron un aumento de su actividad locomotora en un entorno novedoso en el actímetro. Por lo tanto, son más activos, pero parecen menos motivados a explorar un entorno nuevo cuando fueron evaluados en un modelo de búsqueda de la novedad de libre elección, como la prueba del *hole-board*. El mismo efecto fue observado por Stansfield y Kirstein (2007) en el campo abierto y en la prueba del objeto novedoso, pero no fue observado por Sullivan y colaboradores (2011) en test del *hole-board*. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con la variabilidad de la especie (ratas vs ratones) y/o procedimientos (por ejemplo, el test del *hole-board* duró 5 minutos en el estudio antes citado y 10 minutos en nuestro estudio).

Además, hemos visto que los animales tratados con cocaína durante la adolescencia tardan más tiempo en habituarse a un nuevo entorno en la edad adulta. Los animales tratados con solución salina son más activos durante los primeros 10 minutos que en el resto de intervalos de tiempo, mientras que los animales tratados con cocaína requirieron de los primeros 20 minutos para acostumbrarse al entorno novedoso. Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que la administración de cocaína durante la adolescencia, o durante el período prenatal, aumenta la actividad locomotora en los ratones adultos (Estellés y cols., 2005, 2007), un efecto también observado

## ***Estudio 1***

por otros autores (Black y cols., 2006; Hooks y cols., 1991; Stansfield y Kirstein, 2007; Wheeler y cols., 2013). Por otra parte, este aumento en la reactividad locomotora de los animales tratados con cocaína durante la adolescencia podría explicar la disminución en la latencia de entrada en los brazos abiertos del LEC y en el inicio de la conducta de exploración social en la prueba de interacción social, a pesar del hecho de que los ratones pre-tratados con la cocaína no pasaron más tiempo realizando dicha conducta y mostraron una reducción de la conducta exploratoria en el test de búsqueda de la novedad. Sin embargo, no se apreciaron efectos a largo plazo debidos al tratamiento de la cocaína sobre las medidas de ansiedad y actividad locomotora en el LEC. Por tanto, otra posible explicación es que la administración de cocaína en la adolescencia aumenta el nivel de reactividad a la droga en nuestros ratones, y en particular en los HNS, ya que fueron los únicos que desarrollaron un CPL con una dosis subumbral de MDMA y cocaína. Esta alteración inducida por el pre-tratamiento con cocaína puede contribuir a explicar la mayor vulnerabilidad observada en individuos que tienen una experiencia temprana con la cocaína. Tales cambios podrían estar relacionados con las alteraciones de la corteza prefrontal causadas por el consumo de cocaína crónica (es decir, una reducción de la materia gris cortical en la corteza orbitofrontal medial), que podrían llevar a los sujetos a participar en situaciones de mayor riesgo (Volkow y cols., 1991; Tanabe y cols., 2009).

Por lo tanto, aunque la exposición a la cocaína durante la adolescencia no parece inducir alteraciones conductuales muy drásticas, si se han observado leves cambios, tales como una disminución de la exploración ante una situación novedosa y un aumento en la reactividad a la novedad, que podrían estar relacionados con los efectos observados en el paradigma de CPL. La exposición de cocaína en los adolescentes reduce la curiosidad natural de los ratones, especialmente a los individuos HNS, los cuales parecen ser más vulnerables a los efectos de la cocaína. Estos efectos podrían indicar que la exposición de cocaína durante la adolescencia induce alteraciones en el sistema de recompensa del cerebro (Izenwasser y Cox, 1992; Parsons y cols., 1991; Kenny y cols., 2003), que producirán un aumento de las propiedades reforzantes de la drogas y una disminución de las mismas cuando se trata de reforzadores naturales (Bevins y Besheer, 2005), de manera similar a la que se ve entre los consumidores de cocaína. Del mismo modo, los ratones HNS expuestos a la cocaína durante la adolescencia parecen ser más sensibles a las claves ambientales asociadas a la MDMA y la cocaína en el procedimiento de CPL con dosis subumbrales de estas drogas. Es importante destacar que la misma administración tipo *binge* de cocaína durante la edad adulta no produjo tales alteraciones a largo plazo. De hecho, el aumento de la reactividad a la novedad y/o impulsividad inducida por el *binge* de cocaína en ratones HNS

## **Estudio 1**

adolescentes ha sido previamente relacionado (aunque no de manera consistente) con un aumento de los efectos reforzantes de la cocaína, anfetaminas, metanfetaminas o MDMA (Bird y Schenk, 2013; Kabbaj y cols., 2001; Walker y cols., 2009; Yates y cols., 2012).

En resumen, nuestros datos proporcionan evidencia de que la exposición a la cocaína durante la adolescencia a través de una administración de atracones o *binges*, aumenta la sensibilidad de los ratones HNS a los efectos reforzantes de la MDMA y de la cocaína en la edad adulta, mientras que este efecto no se observó cuando la administración se llevó a cabo durante la edad adulta. Sin embargo, el contacto con la cocaína desde edades tempranas induce alteraciones leves en el comportamiento espontáneo observable durante la edad adulta, como una disminución de la conducta exploratoria, un aumento de la reactividad locomotora y una mayor conducta impulsiva.

En conclusión, las alteraciones conductuales a largo plazo inducidas por la exposición de los adolescentes a la cocaína pueden contribuir a entender la mayor vulnerabilidad de muchos individuos expuestos a las drogas en etapas tempranas, en particular los que poseen el fenotipo HNS. Nuestros resultados ponen de manifiesto que los rasgos de personalidad, así como los antecedentes de consumo de drogas



durante la adolescencia son factores a considerar en el desarrollo de programas de prevención y tratamiento del abuso de drogas.



## Higher sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine and MDMA in High-Novelty-Seekers mice exposed to a cocaine binge during adolescence

A. Mateos-García · C. Roger-Sánchez ·  
M. Rodríguez-Arias · J. Miñarro · M. A. Aguilar ·  
C. Manzanedo · M. C. Arenas

Received: 4 September 2013 / Accepted: 23 May 2014 / Published online: 8 June 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

### Abstract

**Rationale** Exposure to drugs during adolescence can induce alterations in the central nervous system. The novelty-seeking personality trait influences differences observed among individuals exposed to drugs of abuse.

**Objectives** Long-term effects of intensive pre-treatment with cocaine during adolescence or adulthood were evaluated in High- and Low-Novelty Seeker (HNS and LNS) mice. It was hypothesized that a cocaine binge during adolescence would increase sensitivity to the rewarding effects of cocaine and MDMA, especially in HNS animals, and modify the spontaneous behaviour of adult animals.

**Methods** Adolescent (PND 33) and adult (PND 60) mice were identified as HNS or LNS according to their performance in the hole-board test. Subsequently, they received pre-treatment with cocaine (three injections per day of an increasing dose for 10 days) or saline. Three weeks later, the mice performed the hole-board, elevated plus maze, spontaneous locomotor activity and cocaine- (1 mg/kg) or MDMA- (1.25 mg/kg) induced conditioning place preference (CPP) tests. In another set of mice, the effects of pre-treatment of cocaine during adulthood on MDMA- or cocaine-induced CPP were also evaluated 3 weeks later.

**Results** Only HNS mice treated with cocaine during adolescence acquired MDMA- or cocaine-induced CPP in adulthood. Moreover, pre-exposure to cocaine during adolescence caused subsequent behavioural alterations, including reduced exploratory behaviour and increased locomotor reactivity.

**Conclusions** Cocaine binge administration during adolescence induces a higher sensitivity to the rewarding effects of MDMA and cocaine in HNS mice in adulthood. This may explain the greater vulnerability often seen among individuals exposed early in life to drugs of abuse.

**Keywords** Cocaine · MDMA · Novelty-seeking · CPP · Adolescence · Mice

### Introduction

Adolescence is a period during which the nervous system is under development and is characterized by an increase in exploration and high-risk behaviours (including drug use) (Casey and Jones 2010; Spear 2011). Preclinical studies have demonstrated that, during adolescence, the balance between aversive and rewarding drug effects tend to tilt towards rewarding effects (for a review, see Schramm-Sapota et al. 2009), which may explain the increased drug use seen among adolescents.

Experience of drugs during adolescence can have long-term effects on behaviour in adulthood. Structural and functional changes in the brain reward system have been observed in cocaine addicts; for example, reduced cortical grey matter in the medial orbitofrontal cortex (OFC; Tanabe et al. 2009). Studies in animal models have demonstrated that chronic cocaine exposure alters induction of  $\Delta$ FosB and CaMKII in the nucleus accumbens (NAcc; Robison et al. 2013) and induces changes in brain regions implicated in addiction (NAcc, striatum, insular cortex, OFC and medial forebrain bundle), with these effects being more pronounced in animals exposed during adolescence (Wheeler et al. 2013). Moreover, a greater dopaminergic response after administration of

A. Mateos-García · C. Roger-Sánchez · M. Rodríguez-Arias · J. Miñarro · M. A. Aguilar · C. Manzanedo · M. C. Arenas (✉)  
Unidad de investigación Psicobiología de las Drogodependencias,  
Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat  
de València, Avda. Blasco Ibañez, 21, 46010 Valencia, Spain  
e-mail: carmen.arenas@uv.es

cocaine is reported in adolescents (Badanich et al. 2006; Walker and Kuhn 2008). Cocaine treatment during adolescence also alters induction of  $\Delta$ FosB in the NAcc (Ehrlich et al. 2002), expression of genes in the prefrontal cortex (PFC; Black et al. 2006), cocaine-induced locomotion (Black et al. 2006; Caster et al. 2005; Wheeler et al. 2013), MDMA-induced conditioning place preference (CPP; Daza-Losada et al. 2009), response to novelty (Stansfield and Kirstein 2007) and anxiety-related behaviours (Sullivan et al. 2011) in adulthood. These changes could contribute to the more pronounced vulnerability to drug abuse and addiction reported in people who have had an early contact with drugs of abuse (Witthen et al. 2008). The high rate of cocaine consumption in the juvenile population (EMCDDA 2013) justifies a more profound study of the long-term behavioural consequences of use of this drug during adolescence.

Besides age, personality factors may also explain differences between individuals regarding vulnerability to drug abuse and dependence (Dellu et al. 1996). The trait of novelty seeking (NS) has been identified as a significant risk factor for the initiation of drug use and the transition from use to abuse (Milivojevic et al. 2012; Kelley et al. 2004; Staiger et al. 2007). In rodents, NS has been defined as a preference for novel objects or environments, or an increased exploration of new situations, objects or unknown stimulus (Ballaz et al. 2007; Nadal Alemany 2008; Belin et al. 2011; Vidal-Infer et al. 2012). Two approaches are used to model the novelty-seeking trait: novelty-induced locomotor activity (i.e. high locomotor reactivity to an inescapable new environment/high- vs. low-responders) and preference for novelty (i.e. high propensity to explore novelty in a free-choice procedure/high- vs. low-novelty seeker, HNS vs. LNS) (Philpot and Wecker 2008; Nadal Alemany 2008). The rate of exploratory behaviours can predict the response of rodents to drugs of abuse (Kabbaj 2006; Vidal-Infer et al. 2012). Preference for novelty has been related to a higher sensitivity to the reinforcing effects of amphetamines (Piazza et al. 1989; Dellu et al. 1996; Klebaur and Bardo 1999; Klebaur et al. 2001), morphine (Zheng et al. 2003; Nadal et al. 2005; Pelloux et al. 2006), cocaine (Belin et al. 2008, 2011; Davis et al. 2008; Vidal-Infer et al. 2012; Arenas et al. 2014) or food (Dellu et al. 1996). Conversely, studies employing cocaine (Gong et al. 1996; Kosten and Miserendino 1998), amphetamines (Erb and Parker 1994; Kliethermes et al. 2007) or alcohol (Kliethermes et al. 2007) have failed to find such a relationship between NS and higher drug sensitivity.

The hole-board task, which was developed by Boissier and Simon (1962; Boissier et al. 1964), provides a simple test for evaluating the response of rodents to an unfamiliar environment by counting the number of head dips they perform. This measure is considered to reflect the exploratory tendencies of mice, which are different to locomotor activity (Calabrese 2008), though it has also been used to assess emotionality

and anxiety in mice (Calabrese 2008; Takeda et al. 1998). The hole-board is useful for evaluating NS, since animals can be classified according to their propensity to explore the apparatus (by the number of head dips) as HNS or LNS (Abreu-Villaça et al. 2006; Kliethermes and Crabbe 2006). In a previous study carried out in our laboratory, we reported a superior predictive capacity of the hole-board test for identifying 'drug-vulnerable' individuals among adolescent mice (Arenas et al. 2014). Considering that adolescence is associated with an increased motivation to seek out new stimuli, and that this behavioural trait of NS may be associated with substance abuse, it is surprising that no study has addressed how the level of NS influences the effects of adolescent cocaine exposure.

Thus, the present study was designed to evaluate the long-term effects of an intensive pre-treatment with cocaine during adolescence in mice with different levels of NS, assuming NS to be a predictor of vulnerability to the development of drug-related problems. With this purpose in mind, adolescent mice were first tested in the hole-board task in order to classify them as HNS or LNS. Later, they received a pre-treatment with cocaine and, 3 weeks after the end of this treatment, their spontaneous and drug-induced behaviour was evaluated (during adulthood). In experiment 1, the long-term effects of a cocaine binge on HNS and LNS mice were evaluated in models of NS (spontaneous motor activity and hole-board test), anxiety (elevated plus maze) and social interaction (agonistic encounter with a co-specific mouse). In experiment 2, the long-term effects of a cocaine binge on the subsequent rewarding effects of cocaine and MDMA on HNS and LNS mice were evaluated in the CPP paradigm. We performed an additional experiment in which adult mice underwent the same experimental procedures as adolescents in experiment 2 in order to control the effect of age at the time of cocaine exposure. We hypothesized that animals pre-treated with cocaine during adolescence would show alterations in their spontaneous behaviour when they became adults and would be more sensitive to the rewarding effects of cocaine and MDMA, particularly HNS.

## Materials and methods

### Subjects

A total of 257 male mice of the OF1 outbred strain were acquired commercially from Charles River (Barcelona, Spain). The animals arrived at our laboratory at 21 days ( $n=177$ ) or 49 days ( $n=80$ ) of age and were housed in groups of four in plastic cages (28-cm length  $\times$  28-cm width  $\times$  14.5-cm height) for 10–12 days prior to initiating experiments, under the following conditions: constant temperature ( $21 \pm 2$  °C), a reversed light schedule (white lights on: 2000–0800 h), and

food and water available ad libitum (except during behavioural tests). No differences were detected between the weight of animals treated with cocaine and those treated with saline ( $p > 0.05$ ). Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The animal use and care committee of the University of Valencia approved the present study.

#### Drug treatment

Cocaine hydrochloride (Laboratorios Alcaiber, Spain) and  $\pm$ 3,4-methylenedioxymethamphetamine hydrochloride (MDMA, racemic mixture; Agencia Española del Medicamento, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, Madrid, Spain) were diluted in physiological saline at a constant volume (0.01 ml/g) and administered i.p. Pre-treatment consisted of three injections per day administered at 1-h intervals between PND 34 and 45 (adolescents) or PND 61 and 72 (adults) with the dose increasing at different points over the 12-day period. From PND 34 to 35, mice received 5 mg/kg; from PND 36 to PND 38, they received 15 mg/kg; and from PND 41 to 45, they received 25 mg/kg (experiment 1). This administration protocol was adapted from that of Sullivan et al. (2011) and has proved to induce long-lasting alterations in rodent behaviour (Black et al. 2006; Sullivan et al. 2011). Based on our previous experience showing that pre-treatment with high doses of cocaine decreases the subsequent rewarding effects of this drug (Manzanedo et al. 2012), mice that were to be conditioned with cocaine or MDMA (experiment 2) received a pre-treatment with lower doses of cocaine following the same administration schedule with 5, 10 and 15 mg/kg. This pre-treatment was initiated on PND 34–35 in the adolescent groups (see Fig. 1b) and on PND 61–62 in the adult groups. Physiological saline injections were administered to control groups in both experiments. The doses of MDMA and cocaine used to induce CPP (1.25 and 1 mg/kg, respectively) were selected on the basis of previous studies in which they were shown to be sub-threshold doses (Daza-Losada et al. 2009; Manzanedo et al. 2010; Vidal-Infer et al. 2012).

#### Apparatus and procedure

##### Hole-board test

This test was carried out in a square box (28×28×20.5 cm) with transparent Plexiglas walls and 16 equidistant holes of 3 cm in diameter in the floor (CIBERTEC SA, Spain). Photocells below the surface of the holes detected the number of

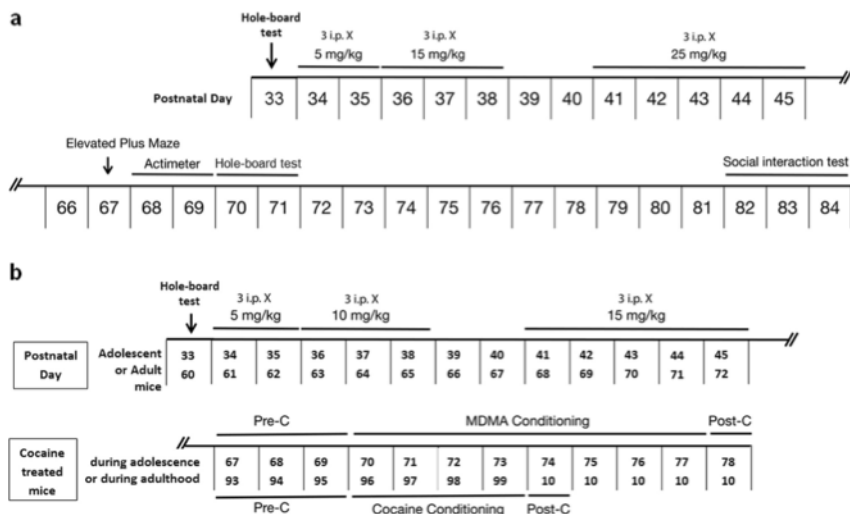
times mice performed a head-dip. At the beginning of the test, mice were placed in the same corner of the box and were allowed to freely explore the apparatus for 10 min. Frequency of head dips was recorded automatically by the apparatus. The illumination in the experimental room consisted of four neon tubes fixed on the ceiling (light intensity of 110 lux at 50 cm above floor level). Prior to the cocaine binge treatment, animals were defined as high NS and low NS according to their head-dip scores (below or above the group median) on PND 33 (adolescents) or PND 60 (adults).

##### Elevated plus maze test

The apparatus consisted of two open arms (30×5×0.25 cm) and two enclosed arms (30×5×15 cm), and the junction of the four arms formed a central platform (5×5 cm). The floor of the maze was made of black Plexiglas and the walls of the enclosed arms of clear Plexiglas. The open arms had a small edge (0.25 cm) to provide additional grip for the animals. The entire apparatus was elevated 45 cm above floor level. Mice were transported to the dimly illuminated laboratory 1 h prior to testing. At the beginning of each trial, subjects were placed on the central platform so that they were facing an open arm, and were allowed to explore for 5 min. The maze was cleaned with a 7 % alcohol swab after each test, after which the device was untouched until completely dry. The mice's behaviour was video recorded and later analysed by an investigator blind to the experimental conditions, using Raton Time 1.0 software (Fixma, S.L., Valencia, Spain). The measurements recorded during the test period were the frequency of entries and the time spent in each section of the apparatus (open arms, closed arms and central platform). An arm was considered to have been visited when the animal placed all four paws on it. The latency time for first entering the open arms, the percentage of time spent in the open arms, the numbers of closed arm entries and the percentage of open arm entries [(open/open+closed)×100] are generally measured by this test (Rodgers and Johnson 1995; Rodgers and Dalvi 1997).

##### Spontaneous motor activity

Spontaneous motor activity was automatically measured by an actimeter (Cibertec S.A., Spain) consisting of eight cages (33×15×13 cm), each with eight infrared lights located in a frame around the cage. Beams were placed 2 cm apart and were positioned on the horizontal axis at 1.6 cm above the floor of the cage (body level of the mice). The different frames were separated from each other by 4 cm and, since they were opaque, prevented animals from seeing conspecifics. The experimental room was illuminated with a dim light (22 W, 1,080 lm) and spontaneous motor activity without previous adaptation to the actimeter was recorded every 10 min for 1 h. The apparatus was cleaned with water between subjects.



**Fig. 1** Experimental design of first (a) and second (b) experiments. Mice were separated into high novelty seekers (*HNS*) and low novelty seekers (*LNS*) according to the number of head dips in the hole-board test on postnatal day (PND) 33 (adolescents) and PND 60 (adults). a In experiment 1, mice received three injections (i.p.) per day (at 1-h intervals) of saline or increasing doses of cocaine (5 mg/kg on PND 34–35, 15 mg/kg on PND 36–38 and 25 mg/kg on PND 41–45). Three weeks after the end of the cocaine treatment, the mice were evaluated in the elevated plus maze test (PND 67), in the actimeter (PND 68–69), to measure spontaneous motor

activity, in the hole-board test (PND 70–71) and in the social interaction test (PND 82, 83 or 84). b In experiment 2, mice received three injections (i.p.) per day (at 1-h intervals) of saline or increasing doses of cocaine (5 mg/kg on PND 34–35 or 61–62, 10 mg/kg on PND 36–38 or 63–65 and 15 mg/kg on PND 41–45 or 68–72). Three weeks after the end of the cocaine treatment, mice were conditioned with 1.25 mg/kg of MDMA (on PND 70–77 or 96–103) or 1 mg/kg of cocaine (on PND 70–73 or 96–99)

#### Social interaction test

This test consisted of confronting an experimental animal and a standard opponent in a neutral cage (61×30.5×36 cm) for 10 min following a 1-min adaptation period prior to the encounter. Standard opponents were rendered temporarily anosmic by intranasal lavage with a 4% zinc sulphate solution 1 day before testing (Smoothy et al. 1986). This anosmic mouse induces an attack reaction in its opponent but does not outwardly provoke or defend itself, since it cannot perceive a pheromone in the urine of other animals that is a cue for mice with a normal sense of smell to elicit aggressive behaviour (Brain et al. 1981; Mugford and Nowell 1970). Behaviour was video-recorded under white illumination, and videotapes were subsequently analysed using a custom-developed programme (Raton Time 1.0, Fixma, S.L., Valencia, Spain) that estimates the time allocated to different functional categories of behaviour (digging, non-social exploration, exploration from a distance, social investigation, threat and attack), each of which is characterized by a series of

different postures and elements. A more detailed description can be found in Rodríguez-Arias et al. (1998).

#### Conditioning place preference

For place conditioning, we employed 12 identical Plexiglas boxes with 2 equal-sized compartments (30.7-cm length×31.5-cm width×34.5-cm height) separated by a grey central area (13.8-cm length×31.5-cm width×34.5-cm height). The compartments have different coloured walls (black vs white) and distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one). Four infrared light beams in each compartment of the box and six in the central area allow the position of the animal and its crossings from one compartment to the other to be recorded. The equipment was controlled by three IBM PC computers using MONPRE 2Z software (CIBERTEC SA, Spain).

Animals were handled briefly on each of the 3 days preceding initiation of the CPP, which consisted of three phases that took place during the dark cycle. In the first phase,



animals were allowed access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) per day on three consecutive days. On day 3, the time spent by an animal in each compartment during a period of 900 s was recorded. In each group, half of the animals received the drug or vehicle in one compartment and the other half in the other compartment. After assigning the compartments, an analysis of variance revealed no significant differences between the time spent in the drug-paired versus vehicle-paired compartments during the pre-conditioning (Pre-C) phase. In the second phase (conditioning), animals were conditioned with MDMA or cocaine through four pairings with the respective compartment. Animals administered with MDMA underwent only one pairing per day, receiving an injection of MDMA (1.25 mg/kg) immediately prior to being confined in the drug-paired compartment for 30 min on days 4, 6, 8 and 10, and physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 30 min on days 5, 7, 9 and 11. Control animals received an injection of physiological saline before being confined for 30 min to either one of the compartments on days 4, 6, 8 and 10, and to the other on days 5, 7, 9 and 11. Animals treated with cocaine underwent two pairings per day on days 4, 5, 6 and 7, receiving an injection of physiological saline immediately before being confined to the vehicle-paired compartment for 30 min and receiving an injection of cocaine (1 mg/kg) after an interval of 4 h, immediately before confinement to the drug-paired compartment for 30 min. The central area was made inaccessible during conditioning by lowering the guillotine doors. During the third phase, or post-conditioning (Post-C), which took place on day 12 (for MDMA) or day 8 (for cocaine), the guillotine doors separating the two compartments were removed and the time spent by the untreated mice in each compartment during a period of 900 s was recorded. The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and that spent in the same compartment in the Pre-C test is considered to be a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive, then the drug has induced a preference for the drug-paired compartment, whereas the opposite indicates the development of an aversion.

Conditioned groups underwent a daily extinction session that consisted of placing the animals in the apparatus (without the guillotine doors separating the compartments) for 15 min. The extinction criterion was fulfilled when there was a lack of significant differences between CPP scores and Pre-C test values in two consecutive sessions. Thus, all the animals in each group were submitted to the same number of extinction sessions independently of their individual scores. Non-conditioned groups underwent only an extinction session to confirm the lack of CPP.

The effects of a priming dose (MDMA or cocaine) were evaluated 24 h after extinction had been confirmed.

Reinstatement tests were the same as those carried out in Post-C (free ambulation for 15 min), except that animals were tested 15 min after administration of a priming dose (half the dose used to induce CPP) of the drug employed during conditioning.

#### Experimental design

An overview of the experimental timing is provided by Fig. 1. In all experiments, animals were first tested in the hole-board (on PND 33 in the case of adolescents and on PND 60 in that of adults) and were considered high novelty seekers (HNS) or low novelty seekers (LNS) according to whether the number of head dips they performed was higher or lower than the median of the group. In experiment 1, animals received the cocaine or saline pre-treatment during their adolescence (PND 34–45), and behavioural tests were run when they had entered adulthood (from PND 67). In this way, the animals were assigned to the following pre-treatment groups: cocaine HNS ( $n=17$ ), cocaine LNS ( $n=20$ ), saline HNS ( $n=14$ ) and saline LNS ( $n=13$ ). Three weeks after pre-treatment had terminated, animals performed the elevated plus maze test, spontaneous motor activity, hole-board test and social interaction test (see Fig. 1a). In experiment 2, four sets of mice were conditioned with MDMA or cocaine 3 weeks after pre-treatment. In the first set, adolescent animals were divided into the following groups: cocaine HNS ( $n=14$ ), cocaine LNS ( $n=14$ ), saline HNS ( $n=14$ ) and saline LNS ( $n=14$ ). They were then conditioned with MDMA. In the second set, adolescent mice were assigned to the following groups: cocaine HNS ( $n=15$ ), cocaine LNS ( $n=14$ ), saline HNS ( $n=14$ ) and saline LNS ( $n=14$ ). They were then conditioned with cocaine. The two remaining sets of adult mice received pre-treatment with cocaine or saline (PND 61–72) and underwent CPP tests 3 weeks later (from PND 93). In the third set, adult mice were divided into one of the following four groups—cocaine HNS ( $n=11$ ), cocaine LNS ( $n=9$ ), saline HNS ( $n=12$ ) and saline LNS ( $n=9$ )—and then conditioned with MDMA. In the fourth set, adult mice were divided into one of the following groups—cocaine HNS ( $n=10$ ), cocaine LNS ( $n=11$ ), saline HNS ( $n=10$ ) and saline LNS ( $n=8$ )—and then conditioned with cocaine (see Fig. 1b). Student's *t* tests showed significant differences between the number of dips performed by HNS and LNS groups ( $ps<0.01$ ).

#### Statistical analyses

A mixed analysis of variance (ANOVA) was performed for each measure in the elevated plus maze, spontaneous motor activity and social interaction test, with two between variables: novelty seeking (NS), with two levels (HNS and LNS), and pre-treatment, with two levels (saline and cocaine). For spontaneous motor activity, an additional ANOVA was

performed with two between variables: novelty seeking, with two levels (HNS and LNS), and pre-treatment, with two levels (saline and cocaine), and a within variable: time, with six levels (the six 10-min periods into which the hour was divided). For the hole-board test and CPP, an ANOVA was performed in order to compare pre- and post-measures with two between variables: novelty seeking, with two levels (HNS and LNS), and pre-treatment, with two levels (saline and cocaine), and a within variable: days, with two levels (pre and post). In the groups that showed CPP, an additional ANOVA with a within variable—days, with four levels (pre, post, extinction and reinstatement)—was performed. A Bonferroni correction was used for post hoc comparisons.

## Results

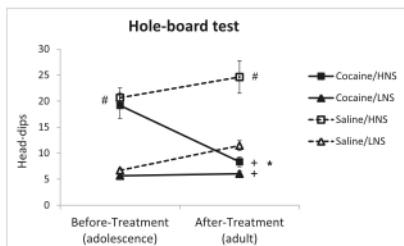
### Hole-board test

The results of the hole-board test are presented in Fig. 2. The ANOVA revealed a significant effect of pre-treatment [ $F(1.67)=34.255$ ;  $p<0.0001$ ] and novelty seeking [ $F(1.67)=107.427$ ;  $p<0.0001$ ]. The interactions days  $\times$  novelty seeking [ $F(1.67)=7.187$ ;  $p<0.009$ ], days  $\times$  pre-treatment [ $F(1.67)=18.473$ ;  $p<0.0001$ ], novelty seeking  $\times$  pre-treatment [ $F(1.67)=7.472$ ;  $p<0.008$ ] and days  $\times$  novelty seeking  $\times$  pre-treatment [ $F(1.67)=5.461$ ;  $p<0.022$ ] were also significant.

In the adulthood, both HNS ( $p<0.0001$ ) and LNS ( $p<0.009$ ) animals that had been treated with cocaine during adolescence performed a lower number of head dips than those treated with saline. HNS adults treated with cocaine performed a lower number of head dips after this treatment ( $p<0.001$ ), whereas those treated with saline did not show any change in this parameter ( $p=0.104$ ). In contrast, LNS adults treated during adolescence with cocaine ( $p=0.830$ ) or saline ( $p=0.063$ ) did not show differences between before and after of pre-treatment. Thus, pre-treatment with cocaine reduced the number of heads dips only in HNS mice.

### Elevated plus maze test

The results of the elevated plus maze are presented in Table 1. The ANOVA for the data of latency of entry into the open arms revealed a significant effect of pre-treatment [ $F(1.40)=6.340$ ;  $p<0.016$ ], novelty seeking [ $F(1.40)=4.918$ ;  $p<0.032$ ], and pre-treatment  $\times$  novelty seeking [ $F(1.40)=4.291$ ;  $p<0.045$ ]. In saline pre-treated groups, LNS showed a higher latency of entry into the open arms than HNS mice ( $p<0.007$ ). Moreover, this latency was shorter among LNS mice exposed to cocaine than among LNS mice exposed to saline; therefore, the differences observed between HNS and LNS animals in the control group disappeared in cocaine-treated animals. No other significant effects were observed.



**Fig. 2** Effect of cocaine binge during adolescence on novelty seeking behavior of adult mice according to the number of head dips in the hole-board test. The significant difference in the number of dips between high novelty seekers (HNS) and low novelty seekers (LNS), observed in adolescent mice ( $p<0.0001$ ), also remained between HNS and LNS saline-treated adult mice ( $p<0.001$ ), but disappeared between HNS and LNS cocaine-treated adults. Therefore, the treatment with cocaine during adolescence (PND 34–45) reduced the amount of dips of HNS adult mice (PND 70–71) in comparison to the number of dips presented before treatment ( $p<0.001$ ). The animals treated with cocaine during adolescence showed lower number of dips than saline-treated mice when they were evaluated in adulthood, both HNS and LNS animals ( $ps<0.001$ ). # $p<0.001$  HNS versus LNS; + $p<0.001$  cocaine versus saline; \* $p<0.001$  cocaine/HNS after-treatment versus before-treatment

### Spontaneous motor activity

The results of spontaneous motor activity are presented in Fig. 3. The ANOVA performed for the data obtained during the whole period (60 min) revealed an effect of pre-treatment [ $F(1.60)=11.597$ ;  $p<0.001$ ], showing animals pre-treated with cocaine to be more active than controls. No significant effect of novelty seeking was observed.

The analysis of spontaneous motor activity in periods of 10 min also revealed a significant effect of the interaction pre-treatment  $\times$  time [ $F(5.300)=3.319$ ;  $p<0.006$ ], with the cocaine groups displaying more activity than the saline groups in all periods except for the last one ( $ps<0.01$ ). In addition, animals pre-treated with saline became habituated more rapidly than those treated with cocaine, since animals treated with cocaine were more active during the first 20 min than in subsequent time periods ( $ps<0.001$ ), while animals treated with saline were also initially more active, but during the first 10-min period only ( $ps<0.001$ ).

### Social interaction test

The data of the behaviours evaluated in the social interaction test are presented in Table 2. The ANOVA revealed an effect of pre-treatment on the latency of social exploration [ $F(1.54)=4.436$ ;  $p<0.05$ ], with cocaine-treated mice showing lower latencies than their saline-treated counterparts. However,



**Table 1** Long-term effects of cocaine administration during adolescence on the performance of high novelty seeker (HNS) and low novelty seeker (LNS) adult mice in the elevated plus maze test

Elevated plus maze test	HNS		LNS	
	Saline pre-treated	Cocaine pre-treated	Saline pre-treated	Cocaine pre-treated
Latency of entry into open arms (s)	11±4.7	1.9±0.4	98.6±44.3	4.9±1.8**
Time in open arms (s)	32.5±9.3	35.5±8.5	41.5±12.6	47.7±7.1
Percentage of time in open arms	19.6±4.5	20.5±4.1	24.3±7.4	27.8±4
Entries in closed arms	16.4±0.8	18.5±1.5	15±1.1	16±1.2
Percentage entries in open arms	16.8±2.6	22.5±3.3	20.6±5.9	25.9±3.3

Long-term effects on latency of entry into open arms, time and percentage of time in open arms, entries in closed arms and percentage of entries in open arms are presented (mean values±SEM). \*\* $p<0.01$  versus LNS saline pre-treated

pre-treatment did not have any effect on time devoted to social exploration.

The ANOVA also revealed an effect of novelty seeking on different behaviours, including non-social exploration [ $F(1.54)=5.940$ ;  $p<0.05$ ], social investigation [ $F(1.54)=8.069$ ;  $p<0.01$ ] and latency to social investigation behaviour [ $F(1.54)=6.916$ ;  $p<0.05$ ]. HNS mice spent more time in non-social exploration and less time in social investigation and showed a shorter latency to initiate this behaviour when compared with their LNS counterparts.

**Conditioning place preference**

**MDMA-induced CPP**

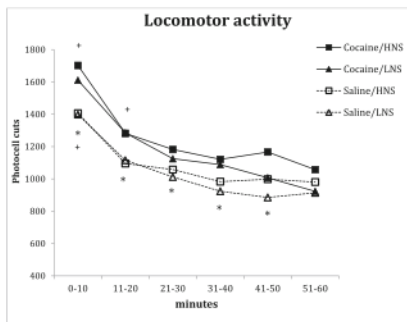
The results of the MDMA-induced CPP are presented in Fig. 4. The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning by mice treated with cocaine during adolescence revealed an effect of the variable days [ $F(1.37)=7.683$ ;  $p<0.01$ ]. The interaction days × NS × pre-treatment was also found to be significant [ $F(1.37)=4.575$ ;  $p<0.05$ ]. Only HNS animals treated with cocaine during adolescence spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than in Pre-C ( $p<0.01$ ). Moreover, there was a significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in Post-C between the groups treated with cocaine during adolescence, with HNS mice spending more time in this compartment than LNS animals ( $p<0.05$ ). The only group that showed MDMA CPP was that of HNS mice treated with cocaine during adolescence (Fig. 4a).

The separate ANOVA for the data of the HNS animals treated with cocaine during adolescence showed an effect of the variable days [ $F(3.7)=4.223$ ;  $p<0.05$ ], with differences detected between Pre-C and Post-C ( $p<0.05$ ), but not between Pre-C and extinction or reinstatement.

The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning by mice pre-treated with cocaine during adulthood did not show any significant effect [ $F(1.37)<3.8$ ] (Fig. 4b).

**Cocaine-induced CPP**

Results obtained for the cocaine-induced CPP are presented in Fig. 5. The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during Pre-C and Post-C by mice treated with cocaine during adolescence revealed an effect of the variable days [ $F(1.38)=12.926$ ;  $p<0.001$ ]. The interactions days × NS [ $F(1,38)=6.232$ ;  $p<0.05$ ] and days × NS × pre-treatment [ $F(1.38)=4.144$ ;  $p<0.05$ ] were also significant. HNS groups



**Fig. 3** A cocaine binge during adolescence increased the locomotor activity of adult mice, both HNS and LNS, during a 60-min period in comparison to the animals pre-treated with saline [ $F(1.60)=11.597$ ;  $p<0.001$ ]. No significant effect of novelty seeking was observed. The interaction Pre-treatment × time [ $F(5.300)=3.319$ ;  $p<0.006$ ] showed that cocaine groups displayed more activity than saline groups in all periods except for the last one ( $ps<0.01$ ). Moreover, animals treated with cocaine showed greater activity during the first 20 min compared with subsequent time periods ( $ps<0.001$ ). However, saline animals only showed greater activity during the first 10 min compared with subsequent time periods ( $ps<0.001$ ). \* $p<0.01$  versus cocaine pre-treated; + $p<0.001$  versus another time periods

**Table 2** Times allocated to different categories of spontaneous behaviour during the social interaction test in HNS and LNS adult mice treated during adolescence with cocaine or saline

Social interaction test	HNS		LNS	
	Saline pre-treated	Cocaine pre-treated	Saline pre-treated	Cocaine pre-treated
Digging	20.2±2.9	18.9±3.3	12.9±2	20.9±2.8
Non-social exploration	455±15	436±13	420±15	408±10
Explore from a distance	25.7±2.4	29.5±3.9	32.3±3.3	27.5±1.9
Social investigation	69.5±8.7	70.3±6.8	88.8±11.3	99.4±7.2
Latency of social investigation	9.2±1.5	4.4±0.8	15.9±4	10.3±1.9
Threat	12±6.4	21.2±12.5	27±11.4	15.8±7.1
Attack	4.5±2.2	10±4.5	8.1±4.2	6.5±2.9

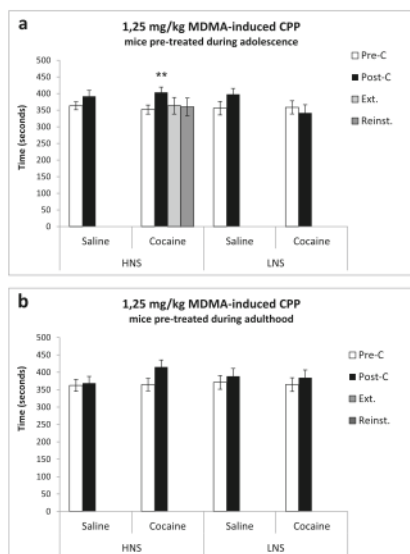
Means of accumulated times (in seconds) with±SEM. \* ANOVA revealed an effect of the pre-treatment in the latency of social exploration [ $F(1,54)=4.436$ ;  $p<0.05$ ], with cocaine-treated mice showing lower latencies than saline treated mice

spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than in Pre-C ( $p<0.001$ ), although only HNS animals pre-treated with cocaine spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than in Pre-C and ( $p<0.01$ ). Moreover,

HNS mice pre-treated with cocaine spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than LNS mice pre-treated with cocaine ( $p<0.01$ ) and HNS mice treated with saline ( $p<0.05$ ). These results indicate that the only group to acquire cocaine CPP was that of HNS mice treated with this drug during adolescence (Fig. 5a).

The separate ANOVA for the data of HNS animals treated with cocaine during adolescence revealed an effect of the variable days [ $F(3,7)=5.209$ ;  $p<0.05$ ], with differences detected between Pre-C and Post-C ( $p<0.05$ ), but not between Pre-C and extinction or reinstatement.

The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning by mice pre-treated with cocaine during adulthood did not show any significant effect [ $F_s(1,35)<3.3$ ] (Fig. 5b).

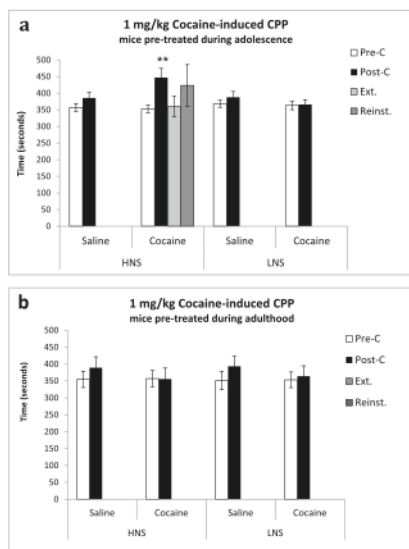


**Fig. 4** CPP induced by 1.25 mg/kg of MDMA in HNS and LNS adult mice treated 3 weeks before, during adolescence (a) or adulthood (b), with cocaine or saline. Bars represent time in seconds spent in the drug-paired compartment during pre-conditioning (white), post-conditioning (black), the last extinction session (light grey) and reinstatement (dark grey). Values are mean±SEM. \*\* $p<0.01$  pre-conditioning versus post-conditioning sessions

**Discussion**

The main goal of our study was to evaluate the long-term effects of cocaine binge administration during adolescence or adulthood according to the novelty seeking trait. For this purpose, animals were separated into high or low novelty seekers and received a cocaine binge on PND 34–45 (adolescent) or on PND 61–72 (adult). Subsequently, they performed different behavioural tests during adulthood (PND>68). Our results show for the first time that repeated administration of cocaine during adolescence alters sensitivity to the rewarding effects of low doses of cocaine and MDMA in HNS animals during adulthood, without inducing other important changes in their behaviour.

There is a higher rate of onset of drug use in adolescence than in other stages of life (Casey and Jones 2010; Spear 2011), probably because decision-making is especially modulated by emotion and social factors such as peer pressure during this developmental period (Blakemore and Robbins 2012). Adolescence is also associated with an increased



**Fig. 5** CPP induced by 1 mg/kg of cocaine in HNS and LNS adult mice treated 3 weeks before, during adolescence (a) or adulthood (b), with cocaine or saline. Bars represent time in seconds spent in the drug-paired compartment during pre-conditioning (white), post-conditioning (black), the last extinction session (light gray) and reinstatement (dark gray). Values are mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  pre-conditioning versus post-conditioning sessions

motivation to seek out new stimuli, and it has been suggested that individuals characterized as HNS are more likely to abuse drugs than LNS. For example, HNS mice (which performed a high number of head-dips during the hole-board test) show an increased preference for nicotine (Abreu-Villaça et al. 2006). Moreover, we have recently observed that only adolescent HNS according to the hole-board (Arenas et al. 2014) and young-adult HNS according to the novel environment test (Vidal-Infer et al. 2012) show greater susceptibility to the rewarding effects of a sub-threshold dose of cocaine in the CPP. We are expanding these results in the present study by demonstrating that the level of novelty seeking also influences the effects of cocaine exposure during adolescence on the subsequent vulnerability of adult animals to drugs of abuse. Adolescent mice with a HNS phenotype are particularly vulnerable to the effects of pre-treatment with cocaine, which subsequently enhance their sensitivity to the rewarding effects of cocaine and MDMA in the CPP paradigm during adulthood. Age proved to be critical in the effects observed, since the cocaine binge did not cause such an enhancement in the

sensitivity of mice to the rewarding effects of cocaine and MDMA in the CPP during adulthood. A tendency to develop CPP after MDMA conditioning was observed among HNS cocaine pre-treated adult mice, but did not reach statistical significance.

As was expected, HNS and LNS saline pre-treated mice did not show CPP when they were conditioned with MDMA or cocaine, since we administered sub-threshold doses (Daza-Losada et al. 2009; Maldonado et al. 2006; Ribeiro Do Couto et al. 2012). However, previous reports by our group have shown that naïve HNS adolescent mice acquire CPP after conditioning with 1 mg/kg of cocaine, a dose that is ineffective in LNS mice (Vidal-Infer et al. 2012; Arenas et al. 2014). The age of the animals at the time of the CPP procedure is likely to have contributed to these differences. In the aforementioned studies, we evaluated sensitivity to the rewarding effects of cocaine in adolescent mice, while adult mice were assessed in the present work. It is well known that adolescent rodents are more sensitive than adults to the rewarding effects of cocaine (for a review see Schramm-Sapota et al. 2009). Moreover, in accordance with our present results, it has been shown that, when male adult rats are classified as HNS versus LNS, neither group develops CPP with 2.5 mg/kg of cocaine (Gong et al. 1996).

Conversely, HNS mice treated with cocaine during adolescence developed CPP after conditioning with sub-threshold doses of MDMA or cocaine, while LNS mice treated with cocaine during adolescence did not acquire CPP. We have previously observed that pre-treatment during adolescence with different drugs of abuse, such as cocaine (Daza-Losada et al. 2009), MDMA (Daza-Losada et al. 2009; Ribeiro Do Couto et al. 2011, 2012), cannabinoids (Manzanedo et al. 2010; Rodríguez-Arias et al. 2010) and alcohol (Ribeiro Do Couto et al. 2011, 2012), increases the rewarding effects of MDMA. Similarly, other researchers have shown that adult rodents pre-treated with several doses of cocaine develop sensitization to the rewarding effects of this drug in CPP paradigm (Lett 1989; Shippenberg and Heidbreder 1995a, b; Shippenberg et al. 1996, 1998) and self-administration (Liu et al. 2005; Morgan et al. 2006). However, in the present study, a binge of increasing doses of cocaine administered to adult mice did not significantly increase the rewarding effects of cocaine and MDMA when mice are tested long-time after cocaine pre-treatment. To our knowledge, this is the first study to evaluate the effects of adolescent exposure to cocaine on the subsequent rewarding effects of this drug in adulthood.

The enhanced response to MDMA and cocaine in the CPP of HNS mice exposed to cocaine during adolescence could be related with the fact that these animals show a stronger behavioural and neurochemical response after drug administration. For example, HNS mice display increased cocaine self-administration (Belin et al. 2011; Davis et al. 2008) and CPP (Vidal-Infer et al. 2012; Arenas et al. 2014), enhanced motor

activity after cocaine administration (Hooks et al. 1991; Chefer et al. 2003) and a more pronounced dopamine response in the nucleus accumbens when compared with LNS animals (Hooks et al. 1991; Chefer et al. 2003). Moreover, cocaine treatment during adolescence increases cocaine-induced locomotion (Black et al. 2006; Wheeler et al. 2013) and MDMA-induced CPP (Daza-Losada et al. 2009) and produces functional and structural changes in brain regions implicated in addiction (Ehrlich et al. 2002; Wheeler et al. 2013). These responses, which have been observed separately in HNS and cocaine pre-treated animals, may interact to confer an enhanced vulnerability to drug response in HNS mice exposed to cocaine during adolescence.

Binge administration of cocaine during adolescence also produced subtle changes in the behaviour of mice in adulthood, particularly in HNS animals, which may have been related with their increased vulnerability to the rewarding effects of cocaine and MDMA. One of these behavioural changes was a decrease in the preference for novelty of adult mice with respect to controls, especially in the case of HNS animals. In this way, differences in the number of dips in the hole-board test between HNS versus LNS were reproduced in control mice in adulthood, whereas they disappeared in cocaine-treated animals. This effect does not seem to have been due to a decrease in activity, as these animals showed an increase in their locomotor activity in a novel environment when measured with the actimeter. Thus, they were more active but seemed less motivated to explore when they were evaluated in a novelty-seeking model of free-choice such as the hole-board test. The same effect was observed by Stansfield and Kirstein (2007) in the open field and novel object recognition tests, but not by Sullivan et al. (2011) in the hole-board task. These discrepancies could be related with differences in species (rats vs. mice) and/or procedures (for example, the hole-board test lasted 5 min in the abovementioned study and 10 min in our study).

Moreover, we have seen that animals treated with cocaine during adolescence take longer to become accustomed to a novel environment in adulthood, as saline-treated animals are more active during the first 10 min than over longer periods of time, while the same can be said of cocaine-treated animals during the first 20 min. We have previously reported that cocaine administration during adolescence or during the prenatal period increases locomotor activity in adult mice (Estelles et al. 2005, 2007), and other authors have also observed this effect (Black et al. 2006; Hooks et al. 1991; Stansfield and Kirstein 2007; Wheeler et al. 2013). On the other hand, this enhanced locomotor reactivity in animals treated with cocaine during adolescence would explain decreases in the latency to enter the open arms of the elevated plus maze and to initiate social exploration in the social interaction test, in spite of the fact that mice pre-treated with cocaine did not spend more time in social investigation and

showed a general reduction in exploratory behaviour in the novelty seeking test. Though, no long-lasting effect on anxiety and locomotor activity measures in the elevated plus maze test has been observed due to cocaine treatment. Therefore, another possible explanation is that cocaine administration in adolescence increased the level of reactivity in our mice, and particularly in HNS, since they were the only ones that developed CPP after conditioning with sub-threshold doses of MDMA or cocaine. This alteration induced by cocaine pre-treatment may contribute to the greater vulnerability seen in individuals who have an early experience with cocaine. Such changes could be related with alterations of the prefrontal cortex (i.e. reduced cortical grey matter in the medial orbitofrontal cortex) caused by chronic cocaine use, which may lead subjects to engage in more risky situations (Volkow et al. 1991; Tanabe et al. 2009).

Thus, although exposure to cocaine during adolescence does not seem to induce dramatic behavioural alterations, subtle changes induced by cocaine binges, such as a decrease of novelty-induced exploration and an increase in novelty reactivity, may be related to the effects that we have observed in the CPP paradigm. Adolescent cocaine exposure undermines the natural curiosity of mice, especially HNS individuals, which would appear to be more vulnerable to the early effects of cocaine. These effects would indicate that cocaine exposure during adolescence induces alterations of the brain reward system (Izenwasser and Cox 1992; Parsons et al. 1991; Kenny et al. 2003) that lead to an increase in the incentive salience of drug-related stimuli and a decrease in that related with natural reinforcers (Bevins and Besheer 2005), similar to that seen among cocaine abusers. Similarly, HNS mice exposed to cocaine during adolescence appear to be more responsive to the environmental cues associated with MDMA and cocaine, developing CPP after conditioning with sub-threshold doses of these drugs. It is important to emphasize that the same cocaine binge administration during adulthood did not produce such marked long-term alterations. Indeed, the increase in novelty reactivity and/or impulsivity induced by adolescent cocaine binges in HNS mice has previously been related (though not consistently) with an increase in the rewarding effects of cocaine, amphetamines, methamphetamines or MDMA (Bird and Schenk 2013; Kabbaj et al. 2001; Walker et al. 2009; Yates et al. 2012).

In summary, our data provide evidence that exposure to cocaine during adolescence via a binge regimen increases the sensitivity of HNS mice to the rewarding effects of MDMA and cocaine in adulthood, while this effect is not observed when administration takes place during adulthood. However, contact with cocaine early on in life induces only subtle alterations in subsequent spontaneous behaviour during adulthood, such as a decrease in exploratory behaviour, increased locomotor reactivity and greater impulsivity-like behaviours. In conclusion, long-term behavioural alterations induced by



adolescent exposure to cocaine may contribute to the greater vulnerability of many individuals exposed to drugs early in life, particularly those possessing the HNS phenotype. Our results highlight personality traits and antecedents of drug consumption during adolescence as factors to be considered in the development of preventative and treatment programs for drug abuse.

**Acknowledgments** We wish to thank Mr. Brian Normanly for his editing of the manuscript. This work was supported by the following research grants: Ministerio de Economía y Competitividad, Dirección General de Investigación (PSI2011-24762), Instituto de Salud 'Carlos III' (FIS), RETICS, Red de Trastornos Adictivos (RD06/001/0016) and Generalitat Valenciana, Conselleria de Educació (PROMETEO/2009/072), Spain.

## References

- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FE, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC (2006) Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 15(167):175–182. doi:10.1016/j.bbr.2005.09.003
- Arenas MC, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2014) in press. Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine
- Badanich KA, Adler KJ, Kirstein CL (2006) Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in the nucleus accumbens septi. *Eur J Pharmacol* 550:95–106. doi:10.1016/j.ejphar.2006.08.034
- Ballaz SJ, Akil H, Watson SJ (2007) Previous experience affects subsequent anxiety-like responses in rats bred for novelty seeking. *Behav Neurosci* 121:1113–1118. doi:10.1037/0735-7044.121.5.1113
- Belin D, Mar A, Dalley J, Robbins T, Everitt B (2008) High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. *Science* 320:1352–1355. doi:10.1126/science.1158136
- Belin D, Berson N, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2011) High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 36:569–579. doi:10.1038/npp.2010.188
- Bevins RA, Besheer J (2005) Novelty reward as a measure of anhedonia. *Neurosci Biobehav Rev* 29:707–714. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.013
- Bird J, Schenk S (2013) Contribution of impulsivity and novelty-seeking to the acquisition and maintenance of MDMA self-administration. *Addict Biol* 18:654–664. doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00477.x
- Black YD, Maclaren FR, Nuydenov AV, Carlezon WA, Baxter MG, Konradi C (2006) Altered attention and prefrontal cortex gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence. *J Neurosci* 26:9656–9665. doi:10.1523/JNEUROSCI.2391-06.2006
- Blakemore SJ, Robbins TW (2012) Decision-making in the adolescent brain. *Nat Neurosci* 15:1184–1191. doi:10.1038/nn.3177
- Boissier JR, Simon P (1962) The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. *Thérapie* 17:1225–1232
- Boissier JR, Simon P, Lwoff JM (1964) Use of a particular mouse reaction (hole-board method) for the study of psychotropic drugs. *Thérapie* 19:571–583
- Brain PF, Benton D, Childs G, Parmigiani S (1981) The effect of the type of opponent in test of murine aggression. *Behav Process* 6:319–327. doi:10.1016/0376-6357(81)90049-8
- Calabrese EJ (2008) An assessment of anxiolytic drug screening tests: Hormetic dose responses predominate. *Crit Rev Toxicol* 38:489–542. doi:10.1080/1040840802014238
- Casey BJ, Jones RM (2010) Neurobiology of the adolescent brain and behavior: implications for substance use disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:1189–1201
- Caster JM, Walker QD, Kuhn CM (2005) Enhanced behavioral response to repeated-dose cocaine in adolescent rats. *Psychopharmacology* 183:218–225. doi:10.1007/s00213-005-0159-4
- Chefer VI, Zakharova I, Shippenberg TS (2003) Enhanced responsiveness to novelty and cocaine is associated with decreased basal dopamine uptake and release in the nucleus accumbens: Quantitative microdialysis in rats under transient conditions. *J Neurosci* 23:3076–3084
- Davis BA, Clinton SM, Akil H, Becker JB (2008) The effects of novelty-seeking phenotypes and sex differences on acquisition of cocaine self-administration in selectively-bred high-responder and low-responder rats. *Pharmacol Biochem Behav* 90:331–338. doi:10.1016/j.pbb.2008.03.008
- Daza-Losada M, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J (2009) Acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice pre-treated with MDMA or cocaine during adolescence. *Addict Biol* 14:447–456. doi:10.1111/j.1369-1600.2009.00173.x
- Dellu F, Piazza PV, Mayo W, Le Moal M, Simon H (1996) Novelty seeking in rats: biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* 34:136–145
- Ehrlich ME, Sommer J, Canas E, Unterwald EM (2002) Periadolescent mice show enhanced Delta FosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 22:9155–9159
- EMCDDA (2013) National report 2013 for the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Spanish Focal Point
- Erb SM, Parker LA (1994) Individual differences in novelty induced activity do not predict strength of amphetamine-induced place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 48:581–586
- Estelles J, Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J (2005) Prenatal cocaine exposure alters spontaneous and cocaine-induced motor and social behaviors. *Neurotoxicol Teratol* 27:449–457. doi:10.1016/j.ntt.2005.01.002
- Estelles J, Lluch J, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Minarro J (2007) Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. *Brain Res Bull* 71:393–403. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.10.008
- Gong W, Neill DB, Justine JB (1996) Locomotor response to novelty does not predict cocaine place preference conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53:191–196
- Hooks MS, Jones GH, Smith AD, Neill DB, Justice JB (1991) Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse* 9:121–128
- Izenwasser S, Cox BM (1992) Inhibition of dopamine uptake by cocaine and nicotine - tolerance to chronic treatments. *Brain Res* 573:119–125. doi:10.1016/0006-8993(92)90120-X
- Kabbaj M (2006) Individual differences in vulnerability to drug abuse: the high responders/low responders model. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:513–520. doi:10.2174/187152706778559318
- Kabbaj M, Norton CS, Kollack-Walker S, Watson SJ, Robinson TE, Akil H (2001) Social defeat alters the acquisition of cocaine self-administration in rats: role of individual differences in cocaine-taking behaviour. *Psychopharmacology* 158:382–387. doi:10.1007/s002130100918
- Kelley AE, Schochet T, Landry CF (2004) Risk taking and novelty seeking in adolescence: introduction to part I. *Ann N Y Acad Sci* 1021:27–32. doi:10.1196/annals.1308.003

- Kenny PJ, Koob GF, Markou A (2003) Conditioned facilitation of brain reward function after repeated cocaine administration. *Behav Neurosci* 117:1103–1107. doi:10.1037/0735-7044.117.5.1103
- Klebaur JE, Bardo MT (1999) Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 63:131–136
- Klebaur JE, Bevins RA, Segar TM, Bardo MT (2001) Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav Pharmacol* 12:267–275
- Kliethermes CL, Crabbe JC (2006) Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85:57–65. doi:10.1016/j.pbb.2006.07.007
- Kliethermes CL, Kamens HM, Crabbe JC (2007) Drug reward and intake in lines of mice selectively bred for divergent exploration of a hole board apparatus. *Genes Brain Behav* 6:608–618. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00289.x
- Kosten TA, Miserendino MJD (1998) Dissociation of novelty- and cocaine-conditioned locomotor activity from cocaine place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 60:785–791
- Lett BT (1989) Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. *Psychopharmacology* 98:357–362. doi:10.1007/BF00451687
- Liu Y, Roberts DCS, Morgan D (2005) Sensitization of the reinforcing effects of self-administered cocaine in rats: effects of dose and intravenous injection speed. *Eur J Neurosci* 22:195–200. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04195.x
- Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J (2006) Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behav Pharmacol* 17:119–131. doi:10.1097/01.fbp.0000190685.84984.ec
- Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Daza-Losada M, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J (2010) Effect of the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice. *Behav Brain Funct* 6:19–30. doi:10.1186/1744-9081-6-19
- Manzanedo C, García-Pardo MP, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA (2012) Pre-treatment with high doses of cocaine decreases the reinforcing effects of cocaine in the conditioned place preference paradigm. *Neurosci Lett* 516:29–33. doi:10.1016/j.neulet.2012.03.044
- Milivojevic D, Milovanovic SD, Jovanovic M, Svrakic DM, Svrakic NM, Svrakic SM, Cloninger CR (2012) Temperament and character modify risk of drug addiction and influence choice of drugs. *Am J Addict* 21:462–467. doi:10.1111/j.1521-0391.2012.00251.x
- Morgan D, Liu Y, Roberts DCS (2006) Rapid and persistent sensitization to the reinforcing effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology* 31:121–128. doi:10.1038/sj.npp.1300773
- Mugford RA, Nowell NW (1970) Pheromones and their effect on aggression in mice. *Nature* 226:967–968. doi:10.1038/226967a0
- Nadal Alemany R (2008) La búsqueda de sensaciones y su relación con la vulnerabilidad a la adicción y al estrés. *Adicciones* 20:59–72
- Nadal R, Rotllant D, Marquez C, Armario A (2005) Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res* 165:72–79. doi:10.1016/j.bbr.2005.06.039
- Parsons LH, Smith AD, Justice JB (1991) Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* 9:60–65. doi:10.1002/syn.890090109
- Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D (2006) Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 84:43–50. doi:10.1016/j.pbb.2006.04.004
- Philpot RM, Wecker L (2008) Dependence of adolescent novelty-seeking behavior on response phenotype and effects of apparatus scaling. *Behav Neurosci* 122:861–875. doi:10.1037/0735-7044.122.4.861
- Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245:1511–1513
- Ribeiro Do Couto B, Rodríguez-Arias M, Fuentes S, Gagliano H, Armario A, Miñarro J, Aguilar MA (2011) Adolescent pre-exposure to ethanol or MDMA prolongs the conditioned rewarding effects of MDMA. *Physiol Behav* 103:585–593. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.012
- Ribeiro Do Couto B, Daza-Losada M, Rodríguez-Arias M, Nadal R, Guerri C, Summavielle T, Miñarro J, Aguilar MA (2012) Adolescent pre-exposure to ethanol and 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) increases conditioned rewarding effects of MDMA and drug-induced reinstatement. *Addict Biol* 17:588–600. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00382.x
- Robison AJ, Vialou V, Mazei-Robison M, Feng J, Kourrich S, Collins M, Wee S, Koob G, Turecki G, Neve R, Thomas M, Nestler EJ (2013) Behavioral and structural responses to chronic cocaine require a feedforward loop involving Delta FosB and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the nucleus accumbens shell. *J Neurosci* 33:4295–4307
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801–810. doi:10.1016/S0149-7634(96)00058-9
- Rodgers RJ, Johnson NJT (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52:297–303. doi:10.1016/0091-3057(95)00138-M
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Pinazo J, Simón VM (1998) Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 8:95–103. doi:10.1016/S0924-977X(97)00051-5
- Rodríguez-Arias M, Manzanedo C, Roger-Sánchez C, Do Couto BR, Aguilar MA, Miñarro J (2010) Effect of adolescent exposure to WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:166–171. doi:10.1016/j.pnpb.2009.10.019
- Schramm-Sapota NL, Walker QD, Caster JM, Levin ED, Kuhn CM (2009) Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animal models. *Psychopharmacology* 206:1–21. doi:10.1007/s00213-009-1585-5
- Shippenberg TS, Heidbreder C (1995a) Sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine: pharmacological and temporal characteristics. *J Pharmacol Exp Ther* 273:808–815
- Shippenberg TS, Heidbreder C (1995b) The delta-opioid receptor antagonist naltrindole prevents sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* 280:55–61. doi:10.1016/0014-2999(95)00185-N
- Shippenberg TS, Heidbreder C, Lefevour A (1996) Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. *Eur J Pharmacol* 299:33–39. doi:10.1016/0014-2999(95)00852-7
- Shippenberg TS, Lefevour A, Thompson AC (1998) Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine and cocaine: differential effects of the K-opioid receptor agonist U69593. *Eur J Pharmacol* 345:27–34. doi:10.1016/S0014-2999(97)01614-2
- Sillivan SE, Black YD, Naydenov AV, Vassoler FR, Hanlin RP, Konradi C (2011) Binge cocaine administration in adolescent rats affects amygdalar gene expression patterns and alters anxiety-related behavior in adulthood. *Biol Psychiatry* 70:583–592. doi:10.1016/j.biopsych.2011.03.035
- Smoothy R, Brain PF, Berry MS, Haug M (1986) Alcohol and social behaviour in group housed female mice. *Physiol Behav* 37:689–694
- Spear LP (2011) Adolescent neurobehavioral characteristics, alcohol sensitivities, and intake: setting the stage for alcohol use

- disorders? *Child Dev Perspect* 5:231–238. doi:10.1111/j.1750-8606.2011.00182.x
- Staiger PK, Kambouropoulos N, Dawe S (2007) Should personality traits be considered when refining substance misuse treatment programs? *Drug Alcohol Rev* 26:17–23
- Stansfield KH, Kirstein CL (2007) Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood. *Pharmacol Biochem Behav* 86:637–642. doi:10.1016/j.pbb.2007.02.008
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T (1998) Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350:21–29. doi:10.1016/S0014-2999(98)00223-4
- Tanabe J, Tregellas JR, Dalwani M, Thompson L, Owens E, Crowley T, Banich M (2009) Medial orbitofrontal cortex gray matter is reduced in abstinent substance-dependent individuals. *Biol Psychiatry* 65:160–164. doi:10.1016/j.biopsych.2008.07.030
- Vidal-Infer A, Arenas MC, Daza-Losada M, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2012) High novelty-seeking predicts greater sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 102:124–132. doi:10.1016/j.pbb.2012.03.031
- Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Hitzemann R, Dewey S, Bendriem B, Alpert R, Hoff A (1991) Changes in brain glucose-metabolism in cocaine dependence and withdrawal. *Am J Psychiatry* 148:621–626
- Walker QD, Kuhn CM (2008) Cocaine increases stimulated dopamine release more in periadolescent than adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 30:412–418. doi:10.1016/j.ntt.2008.04.002
- Walker QD, Schramm-Sapota NL, Caster JM, Waller ST, Brooks MP, Kuhn CM (2009) Novelty-induced locomotion is positively associated with cocaine ingestion in adolescent rats; anxiety is correlated in adults. *Pharmacol Biochem Behav* 91:398–408. doi:10.1016/j.pbb.2008.08.019
- Wheeler AL, Lerch JP, Chakravarty MM, Friedel M, Sled JG, Fletcher PJ, Josselyn SA, Frankland PW (2013) Adolescent cocaine exposure causes enduring macroscale changes in mouse brain structure. *J Neurosci* 33:1797–1803
- Wittchen HU, Behrendt S, Hofer M, Perkonig A, Lieb R, Buhringer G, Beesdo K (2008) What are the high risk periods for incident substance use and transitions to abuse and dependence? Implications for early intervention and prevention. *Int J Methods Psychiatr* 17:S16–S29. doi:10.1002/mpr.254
- Yates JR, Marusch JA, Gipson CD, Beckmann JS, Bardo MT (2012) High impulsivity in rats predicts amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 100:370–376. doi:10.1016/j.pbb.2011.07.012
- Zheng X, Ke X, Tan B, Luo X, Xu W, Yang X, Sui N (2003) Susceptibility to morphine place conditioning: relationship with stress-induced locomotion and novelty-seeking behavior in juvenile and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75:929–935. doi:10.1016/S0091-3057(03)00172-2





## **7.2. Estudio 2: Efectos a largo plazo de una exposición al etanol sobre los efectos reforzantes de la cocaína.**

Este estudio está publicado en la revista *Psychopharmacology* (Berl). 2015 Aug;232(16):2995-3007. doi: 10.1007/s00213-015-3937-7.

### **7.2.1. Introducción**

El alcohol es la droga más consumida entre los adolescentes: entre un 75%-82% de los estudiantes (entre 14 y 18 años) lo han consumido alguna vez. Así mismo, el 45.5% informaron de un consumo excesivo de alcohol en el último año (ESTUDES, 2013) y el 29.2% confirmó haber practicado *binge drinking* dentro del último mes (Center for Disease Control, 2013). El porcentaje de adolescentes que realiza este modelo de consumo de alcohol, intensivo e intermitente, aumenta con la edad gradualmente y es similar en diferentes países (Hibell y cols., 2011; Degenhardt y cols., 2013; Johnston y cols., 2013). Este tipo de consumo, denominado *binge*, ha sido definido como un patrón de consumo de alcohol que produce una concentración de alcohol en sangre de 0.08 gramos por ciento o superior (cinco o más bebidas en un hombre adulto, o cuatro o más bebidas en el caso de una mujer adulta) en un intervalo de aproximadamente 2 horas (NIAAA, 2004). El modelo de *binge drinking* tiene una alta prevalencia en ambos sexos,

## **Estudio 2**

pero es aún más elevada entre chicas durante los 14 a 16 años de edad (Hibell y cols., 2011; ESTUDES, 2013). Además, se sabe que el 3.3% de los adolescentes (14-18 años) consumen cocaína durante la práctica del *binge drinking*, mientras que sólo el 0.4% de los adolescentes la consumen fuera de esa situación (ESTUDES, 2013). Así mismo, los adultos adictos a la cocaína presentan un consumo de alcohol más temprano que los no adictos (15.5 años frente a 18.1 años) (Arias y cols., 2013). Estos datos sugieren que el consumo de alcohol, especialmente de manera intensiva, está asociado a una mayor prevalencia de consumo de otras drogas, incluyendo la cocaína.

La adolescencia es un período crítico en el desarrollo de las enfermedades adictivas. El cerebro es una de las principales dianas para el etanol (EtOH), y su consumo intensivo produce alteraciones significativas en la estructura, fisiología y función de este órgano (Harper y Matsumoto, 2005). Estudios recientes han demostrado que el consumo intensivo de alcohol durante un período de maduración del cerebro tal como la adolescencia, puede tener un impacto negativo sobre la estructura y la función del mismo, causando importantes consecuencias cognitivas y comportamentales a corto y a largo plazo (Alfonso-Loeches y Guerri, 2011). De hecho, estos efectos perjudiciales producidos por el EtOH son generalmente irreversibles (Guerri, 2002). En animales adolescentes de experimentación, la intoxicación episódica por alcohol o de tipo *binge*, aumenta la muerte celular en el

neocórtex, hipocampo y cerebelo (Pascual y cols., 2007; McClain y cols., 2014). Además, el EtOH induce una mayor liberación de DA en ratas jóvenes que en adultos, comparado con sus controles (Pascual y cols., 2009). Estos efectos podrían explicar por qué los animales adolescentes son más sensibles que los adultos a algunos de los efectos placenteros del EtOH, incluyendo la facilitación de las relaciones sociales (Varlinskaya y Spear, 2002), pero a su vez, son menos sensibles a las consecuencias negativas del alcohol sobre el deterioro motor (Spear y Varlinskaya, 2005) o a los efectos de la resaca (Doremus y cols., 2003). De hecho, el aumento de los niveles de DA producido por la exposición al EtOH durante la adolescencia continúa siendo elevado durante la edad adulta (Badanich y cols., 2007). Estos cambios podrían contribuir a la mayor vulnerabilidad a la adicción y al abuso de drogas de aquellas personas que hubiesen tenido un contacto temprano con las drogas de abuso, incluyendo el alcohol (Wittchen y cols., 2008).

Igualmente, se sabe que el uso temprano del alcohol correlaciona con una mayor probabilidad de realizar un uso abusivo de alcohol en la edad adulta (Grant y cols., 2001; Hingson y cols., 2006; Cable y Sacker, 2008; Molet y cols., 2012; Quoilin y cols., 2014; Varlinskaya y cols., 2014). Sin embargo, han sido menos estudiadas y aún no están claras las consecuencias de la exposición al EtOH durante la adolescencia sobre la probabilidad de abusar de otras drogas durante la etapa

## **Estudio 2**

adulta. Los estudios realizados en nuestro laboratorio, y también por otros grupos, han demostrado que la exposición al alcohol durante la adolescencia aumenta los efectos reforzantes de otras drogas de abuso (Do Couto y cols., 2011; Hutchison y Riley, 2012; Molet y cols., 2013; Montagud-Romero y cols., 2014). En concreto, la exposición al EtOH de los ratones adolescentes alteró sus conductas espontáneas en la vida adulta (Rodríguez-Arias y cols., 2011; Montagud-Romero y cols., 2014), incrementó la sensibilidad a los efectos reforzantes condicionados de la MDMA y de la cocaína (Do Couto y cols., 2011; Hutchison y Riley, 2012; Molet y cols., 2013; Montagud-Romero y cols., 2014), atenuaron los efectos aversivos de la cocaína (Hutchison y cols., 2010), y se modificaron los niveles de monoaminas cerebrales (Do Couto y cols., 2011; Rodríguez-Arias y cols., 2011). Además, el rasgo de búsqueda de la novedad de los animales moduló estos efectos a largo plazo (Montagud-Romero y cols., 2014).

Los estudios antes mencionados evaluaron la exposición al EtOH en animales adolescentes machos; sin embargo, se han visto diferencias de sexo en los efectos a largo plazo del consumo de alcohol de los adolescentes sobre las estructuras cerebrales (Koss y cols., 2012) y sobre las propiedades aversivas del alcohol (Sherrill y cols., 2011a). Por ejemplo, en adultos, la administración tipo *binge* de EtOH durante la adolescencia produjo una disminución del número de células gliales en la corteza prefrontal medial de los machos, posiblemente debido a una

reducción en su proliferación, mientras que no se observaron cambios en las hembras (Koss y cols., 2012). Igualmente, la pre-exposición al EtOH durante la adolescencia disminuyó la aversión condicionada inducida por EtOH en ratas machos adultas, pero no en hembras (Sherrill y cols., 2011a), si bien es cierto que no se observaron estas diferencias sexuales en el caso de hembras ovariectomizadas antes de la pubertad (Sherrill y cols., 2011b).

Un estudio previo observó que la exposición al etanol durante la adolescencia sensibilizó los efectos reforzantes condicionados de la cocaína en ratas machos adultas, alterando la curva dosis-respuesta de la cocaína (Hutchison y Riley, 2012). Por lo tanto, el presente estudio fue diseñado para evaluar los efectos a largo plazo de la exposición al EtOH durante la adolescencia en un patrón de consumo tipo *binge* sobre la sensibilidad a la cocaína durante la edad adulta en ambos sexos. Para llevarlo a cabo, los ratones adolescentes recibieron un pre-tratamiento con EtOH utilizando un modelo validado de exposición al EtOH en roedores adolescentes (Pascual y cols., 2007, 2009, 2012; Rodríguez-Arias y cols., 2011). Además, es importante añadir que la dosis utilizada (2.5 g/kg) induce una concentración de etanol en sangre similar a la alcanzada por un ser humano en la práctica del *binge drinking* (Rodríguez-Arias y cols., 2011; Roger-Sánchez y cols., 2012). Tres semanas después de la última administración de EtOH, los ratones adultos fueron evaluados en los

## **Estudio 2**

tres paradigmas más utilizados para evaluar la acción de la cocaína en los animales: actividad locomotora inducida por la cocaína, condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) y autoadministración intravenosa. En el experimento 1, se evaluó la respuesta locomotora inducida por diferentes dosis agudas de cocaína en ratones adultos pre-expuestos a EtOH o vehículo durante la adolescencia. En el experimento 2, otro grupo de ratones pre-expuestos a EtOH o vehículo fue evaluado en primer lugar en el CPL inducido por una dosis sub-umbral de cocaína y después, en el paradigma operante de autoadministración intravenosa de cocaína. Por tanto, nuestra hipótesis es que un *binge* de EtOH durante la adolescencia tendrá un impacto diferente sobre los efectos de la cocaína en los ratones machos y hembras adultos.

### **7.2.2. Material y métodos**

#### **7.2.2.1. Sujetos experimentales**

Se emplearon un total de 62 ratones (Charles River, Barcelona, España) de la cepa OF1 (31 machos y 31 hembras) en el experimento 1, y 49 ratones de la misma cepa en los experimentos 2 y 3 (24 machos y 25 hembras). Los

animales llegaron al laboratorio en el día postnatal (PND) 21, y fueron alojados en grupos de cuatro en jaulas de plástico (28 cm largo x 28 cm de ancho x 14.5 cm de altura) en las siguientes condiciones: temperatura constante ( $21 \pm 2^\circ \text{C}$ ), humedad relativa del 60%, ciclo de luz 12h no invertido (luz encendida de 08:00 a 20:00), y comida y agua disponible *ad libitum* (excepto durante las pruebas de conducta). Los animales de cada jaula fueron asignados al mismo tipo de pre-exposición durante la adolescencia. Al no ser un objetivo del presente estudio examinar la regulación hormonal de los efectos a largo plazo de la exposición a EtOH durante la adolescencia, no se controló el ciclo estral de las hembras, aunque hay que tener en cuenta que todas las pruebas de comportamiento duraron 4-5 días, que es la duración del ciclo estral en roedores. Los procedimientos realizados a los ratones, así como su cuidado, se llevaron a cabo en acuerdo a las leyes y regulaciones nacionales, regionales y locales, que están en conformidad con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 en la protección de los animales utilizados con fines científicos.

#### **7.2.2.2. Tratamiento farmacológico**

El etanol (EtOH) fue diluido en suero fisiológico (0,9% NaCl) en un volumen de 0.02 ml/g y administrado vía i.p. en una concentración de

## **Estudio 2**

2.5 g/kg/dosis. El clorhidrato de cocaína (Laboratorios Alcaliber, España) se diluyó en suero fisiológico (0,9% NaCl) y, de acuerdo con el procedimiento experimental, se administró i.p. en un volumen de 0.01 ml/g en el procedimiento de CPL o vía i.v. en un volumen de 23.5 µl en el paradigma de autoadministración.

### **7.2.3. Aparatos**

La respuesta de actividad locomotora inducida por una dosis aguda de cocaína o vehículo se midió de manera automática con ocho actímetros (Cibertec SA, España), cada uno de los cuales consiste en una caja (33x15x13 cm) compuesta con ocho haces de infrarrojos situados en un marco alrededor de la misma a 1.6 cm del nivel del suelo (coincidiendo con la altura del cuerpo de los ratones). Los actímetros se colocaron separados unos de otros por 4 cm, y como los marcos son negros, los animales no se veían entre sí. La habitación experimental se iluminó con una luz tenue (22 W, 1080 lm). El aparato fue limpiado con agua entre los sujetos.

Para el procedimiento de CPL se emplearon ocho cajas de plexiglás, con dos compartimentos (30,7 cm largo x 31.5 cm de ancho x 34.5 cm de altura) separados por una zona central gris (13,8 cm largo x 31.5 cm de ancho x 34.5 cm de altura). Los compartimentos tienen diferente color en las paredes (negro vs. blanco) y diferentes texturas en el suelo



(suelo liso en el compartimento negro vs. suelo rugoso en el blanco). Para registrar de manera automática la posición del animal, así como el número de cruces entre compartimentos, las cajas están equipadas con cuatro haces de luz infrarroja en cada compartimento y seis en la zona central. Se utilizaron dos ordenadores IBM y el software MONPRE 2Z (Cibertec SA, España).

Los experimentos de autoadministración se realizaron en cinco cajas de condicionamiento operante para ratón (Modelo ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, Vermont, EE.UU.), las cuales poseen dos agujeros en su interior pensados para que el animal pueda introducir la cabeza en ellos para explorarlos. Dichos agujeros fueron denominados como agujero activo (cuando el animal introducía la cabeza recibía una infusión o refuerzo) y como agujero inactivo. Una exploración profunda del agujero por parte del animal (*nose-poke*) en el agujero activo provocó la liberación de un refuerzo (una infusión de cocaína), mientras que un *nose-poke* en el agujero inactivo no tenía consecuencias. La mitad de la muestra fue entrenada a asociar el refuerzo con el agujero derecho de la caja, y la otra mitad de la muestra fue entrenada con el agujero izquierdo. Las cajas de condicionamiento operante estuvieron metidas dentro de cajas aislantes de la luz y el ruido exterior, y estuvieron equipadas con ventiladores para proporcionar ventilación y sonido ambiental. El orificio activo iba acompañado de una luz situada encima del mismo, y que fue asociada de manera contingente a la liberación del refuerzo.

## **Estudio 2**

Al realizar un *nose-poke* en el agujero activo, la luz asociada se encendía y, al mismo tiempo, el ratón recibía una infusión de droga. La cocaína fue administrada mediante una jeringa conectada a una bomba de microinfusión (PHM-100A, MED Associates, Inc., Georgia, Vermont, EE.UU.) y conectada a través de tubo *Tygon* (0,96 mm od, Portex Bellas Bore Polietileno Tubing, Portex Limited, Hythe, Kent, Reino Unido) y un *swivel* (375/25, Instech laboratorios, Plymouth Meeting, PA, EE.UU.). Dicho tubo iba conectado vía i.v. al catéter insertado mediante cirugía.

### **7.2.4. Diseño experimental y procedimientos**

#### **7.2.4.1 Pre-exposición al etanol**

En la Tabla 1 se proporciona una visión general del procedimiento experimental de cada experimento. En ambos experimentos y después de un período de aclimatación de 5 días (PND 26), los animales adolescentes recibieron 16 dosis de EtOH (2.5 g/kg) o solución salina durante un período de 2 semanas, de acuerdo con el siguiente calendario: dos administraciones diarias (con un intervalo de 4 horas entre inyecciones) en dos días consecutivos separados por un intervalo de 2 días libres de fármaco. Los animales fueron inyectados en el PND

26, 27, 30, 31, 34, 35, 38 y 39. De esta manera, la administración de EtOH simula un patrón consumo intensivo e intermitente como el observado en adolescentes y adultos jóvenes humanos (Pascual y cols., 2012; Rodríguez-Arias y cols., 2011). Se escogió la vía intraperitoneal con el fin de garantizar que todos los animales recibieran la misma cantidad de EtOH. Además, esta administración acelera el proceso de absorción y es menos estresante para los animales en comparación a la administración oral forzada. Las pruebas de conducta se realizaron tres semanas después de la exposición previa al EtOH, cuando los ratones ya eran adultos (a partir de PND 60).

**7.2.4.2. Experimento 1: Efectos a largo plazo de un consumo intensivo e intermitente de EtOH sobre la respuesta locomotora inducida por diferentes dosis de cocaína.**

De acuerdo con el tratamiento recibido durante la adolescencia, se establecieron los siguientes grupos experimentales: machos pre-tratados con EtOH: n=15; machos pre-tratados con suero fisiológico: n=16; hembras pre-tratadas con EtOH: n=16; hembras pre-tratadas con suero fisiológico: n=15. Tras una espera de 3 semanas, todos los animales pre-tratados durante la adolescencia recibieron una dosis de cocaína (0, 1, 5, 10 ó 20 mg/kg, ip) en cada sesión semanal (PND 60-

## ***Estudio 2***

91). Para contrabalancear el orden de la administración de las dosis se empleó un diseño de cuadrado latino (Zeelenberg y Pecher, 2015) (ver Tabla 1 para más información). La sala donde se realizó el experimento se iluminó con una luz tenue (22 W, 1080 lm) y se limpió el aparato con agua tras cada uso. Los ratones se habituaron a los actímetros durante los primeros 60 minutos y, una vez transcurridos, se les inyectó la cocaína y se comenzó a cuantificar la actividad motora durante los siguientes 60 min para evaluar su nivel de actividad. El recuento de las fotocélulas se registró cada minuto durante las dos fases: habituación y reactividad a la cocaína.

### **7.2.4.3. Experimento 2: Efectos a largo plazo de un consumo intensivo de EtOH en el paradigma de CPL y en la autoadministración intravenosa de cocaína.**

En base al tratamiento recibido durante la adolescencia se establecieron los siguientes grupos experimentales: machos pre-tratados con EtOH: n=12; machos pre-tratados con suero fisiológico: n=12; hembras pre-tratadas con EtOH: n=12; hembras pre-tratadas con suero fisiológico: n=13. Tras un tiempo de espera de tres semanas, todos los animales fueron condicionados en el CPL con 1 mg/kg de cocaína. Posteriormente, los ratones fueron sometidos al procedimiento de auto-administración intravenosa.

**Pre-exposición:**

<b>PND</b>	<b>21</b>	<b>26-27</b>	<b>30-31</b>	<b>34-35</b>	<b>38-39</b>
	Llegada	Pre-exposición a etanol/salino 1ª Dosis: 9h 2ª Dosis: 13 h	Pre-exposición a etanol/salino 1ª Dosis: 9h 2ª Dosis: 13 h	Pre-exposición a etanol/salino 1ª Dosis: 9h 2ª Dosis: 13 h	Pre-exposición a etanol/salino 1ª Dosis: 9h 2ª Dosis: 13 h

**A) Experimento 1: Respuesta locomotora inducida**

<b>PND</b>	<b>40-59</b>	<b>60-64</b>	<b>67-70</b>	<b>74-77</b>	<b>81-84</b>	<b>88-91</b>
	Sin tratamiento	Administración salino  Todos los animales	Administración de cocaína  Grupo A: 1 mg/kg Grupo B: 5 mg/kg Grupo C: 10 mg/kg Grupo D: 20 mg/kg	Administración de cocaína  Grupo A: 5 mg/kg Grupo B: 10 mg/kg Grupo C: 20 mg/kg Grupo D: 1 mg/kg	Administración de cocaína  Grupo A: 10 mg/kg Grupo B: 20 mg/kg Grupo C: 1 mg/kg Grupo D: 5 mg/kg	Administración de cocaína  Grupo A: 20 mg/kg Grupo B: 1 mg/kg Grupo C: 5 mg/kg Grupo D: 10 mg/kg

**B) Experimento 2: CPL y autoadministración intravenosa**

<b>PND</b>	<b>60-62</b>	<b>63-66</b>	<b>67</b>	<b>134-162</b>	<b>137-175</b>
	CPL: Pre-C	CPL: Condicionamiento	CPP: Post-C	Cirugía	Autoadministración

Tabla 1. Diseño experimental

## **Estudio 2**

### **7.2.4.4. Procedimiento de CPL**

El procedimiento, no sesgado (*unbiased*) en términos de preferencia espontánea inicial, se realizó como se ha descrito previamente en otros estudios (Manzanedo y cols., 2001). Los animales fueron manipulados en cada uno de los 3 días anteriores a la iniciación del CPL. Este procedimiento constó de tres fases que tuvieron lugar durante el ciclo de luz. En la primera fase, los animales accedieron libremente a ambos compartimientos del aparato durante 15 minutos (900 segundos) por día, durante 3 días consecutivos. El día 3 se registró el tiempo empleado por cada animal en cada compartimento durante un período de 900 segundos. En cada grupo, la mitad de los animales recibieron el fármaco o vehículo en un compartimento y la otra mitad en el otro compartimento. Después de asignar los compartimentos, se realizó un análisis de varianza el cual no reveló diferencias significativas entre el tiempo pasado en el compartimento asociado al vehículo en comparación al compartimento asociado a la droga durante la fase de pre-condicionamiento (Pre-C) (PND 60-62). En la segunda fase (condicionamiento), los animales fueron condicionados con cocaína a través de cuatro emparejamientos con el compartimento escogido para realizar la asociación. Los animales recibieron dos asociaciones (cocaína y salino) cada día en los PND 63, 64, 65 y 66, en los cuales recibieron una inyección de solución salina inmediatamente antes de ser confinados al compartimento asociado

al vehículo durante 30 min y, tras un intervalo de 4 h, recibieron una inyección de cocaína (1 mg/kg) inmediatamente antes del confinamiento en el compartimento asociado a la droga durante 30 min. La zona central fue inaccesible durante el condicionamiento. Durante la tercera fase o post-condicionamiento (Post-C), que tuvo lugar durante el PND 67, se retiraron las puertas que separan ambos compartimentos y se registró el tiempo dedicado por los ratones en cada compartimento durante un período de 900 segundos. La diferencia en segundos entre el tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga en la fase de Post-C y el tiempo en el mismo compartimento en el Prueba de Pre-C se considera una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga. Si esta diferencia es positiva podremos decir que el fármaco ha inducido una preferencia por el compartimento asociado a la droga, mientras que lo contrario indica el desarrollo de una aversión.

#### **7.2.4.5. Procedimiento de auto-administración**

Se anestesió a los ratones con isoflurano (1.5-2.0%) y se les implantó catéteres intravenosos (Soria y cols., 2005). Para la analgesia fueron pre-tratados por vía subcutánea con buprenorfina 0.5 mg/kg (Buprex Schering-Plough SA, España) y meloxicam 2 ml/kg (Metacam Boehringer Ingelheim SA, España), e inmediatamente después de la

## ***Estudio 2***

cirugía recibieron cefazolina 50 mg/ml (Laboratorios Normon SA, España) i.v. El catéter consistió en un tubo de 6 cm de largo (0.3 mm de diámetro interior, 0.6 mm de diámetro exterior) (Silastic®, Dow Corning, Houdeng-Goegnies, Bélgica) el cual fue ajustado a una cánula de acero de calibre 22 (Semat, Herts, Reino Unido) doblada en ángulo recto e incrustada en un disco de cemento (Dentalon Plus, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemania) con una malla de nylon colocada en el inferior. El tubo del catéter se insertó 1 cm en la vena yugular derecha del animal, y fijado con hilo de sutura. El tubo restante se colocó por vía subcutánea hacia la cánula, dando salida en la región dorsal del animal. Todas las incisiones fueron suturadas y recubiertas con una pomada antibiótica (Plasimine 20 mg/g, GlaxoSmithKline, SA, Madrid, España). Tras la cirugía, los animales fueron alojados individualmente y se dejaron pasar 2-3 días antes del inicio de las sesiones de auto-administración. Cada vez que el comportamiento de auto-administración del animal se desvió considerablemente en comparación al observado anteriormente, se evaluó la patencia de los catéteres intravenosos inyectando una infusión de 0.1 ml de tiobarbital 5 mg/ml (Braun Vetcare SA España) a través del catéter. Si los signos de anestesia no se hacían evidentes a los 3 s de la infusión, el ratón era retirado del experimento. Al final del experimento se evaluó de nuevo la patencia de los catéteres; cuando el resultado fue negativo, el ratón y sus datos correspondientes fueron retirados del experimento.



Las sesiones de autoadministración de cocaína (PND 137-175) se llevaron a cabo 2-3 días después de la cirugía. Los ratones fueron entrenados en las cajas de condicionamiento operante a realizar *nose-pokes* en el agujero activo (exploración profunda del agujero) para obtener infusiones de cocaína (1 mg/kg/infusión) durante un período de 10 días. La dosis de 1 mg/kg por infusión de cocaína fue elegida en base a estudios previos (Soria y cols., 2005; Martini y Valverde 2012; Martini y cols., 2014), así mismo, para realizar el test de ratio progresiva (PR) se empleó la misma dosis. Los ratones fueron trasladados a la sala conducta débilmente iluminada, 15 minutos antes de la prueba. Las sesiones de auto-administración (1h al día) se llevaron a cabo días consecutivos, y comenzaron con una infusión *priming* de la droga y una señal de luz de 6 seg (sobre el agujero activo). Previo a estos 10 días, el que llamamos día 0, los animales estuvieron 1 hora en la caja de condicionamiento operante y recibieron 6 infusiones *priming* asociadas a la señal de luz del agujero activo. El objetivo de esta sesión preliminar fue facilitar el proceso de aprendizaje. La *light house* (luz que ilumina totalmente la caja de condicionamiento operante en su interior) se encendió durante 3 seg al inicio y permaneció apagada durante el resto de la sesión. Al realizar un *nose-poke* en el agujero activo el animal recibía una infusión de cocaína a la vez que se activaba la señal de luz durante 6 s. Los ratones fueron entrenados para realizar *nose-pokes* para obtener la cocaína bajo un programa de refuerzo de ratio fija 1 (FR1) de modo que un

## **Estudio 2**

*nose-poke* en el agujero activo resultaba en una infusión de 23,5  $\mu$ l de cocaína durante 2 seg, mientras que un *nose-poke* en el agujero inactivo no producía ningún efecto. Se estableció un período de tiempo de espera de 15 seg después de cada refuerzo. Durante este período de 15 seg, no hubo recompensa al realizar *nose-poke* en el agujero activo y la clave lumínica no se activaba. Una vez que el período de tiempo fuera finalizaba, la droga volvía a estar disponible sin una señal para indicar la nueva disponibilidad. También se registraron las respuestas al agujero inactivo y cualquier respuesta durante el período de tiempo fuera de 15 seg. La sesión terminaba después de entregar 50 infusiones o después de 1 h, dependiendo de lo que sucediera primero.

Se consideró que los ratones adquirieron la conducta de auto-administración cuando cumplían los siguientes tres criterios: que al menos el 70% del total de las respuestas fueran ejecutadas en el agujero activo; que el número de respuestas reforzadas en el agujero fuera de un mínimo de seis; y que la desviación de la media del número total de refuerzos obtenidos en tres sesiones consecutivas fuera menor al 30% (estabilidad del 70%). El porcentaje de animales que cumplieron los criterios de adquisición fue del 71% y el tiempo medio para cumplir con dicho criterio fue de  $6 \pm 2$  días (machos:  $7 \pm 2$  y hembras:  $5 \pm 2$  días).

Después de diez días de adquisición, el programa de refuerzo se cambió por el PR, y sólo los animales que habían cumplido con los tres criterios de adquisición continuaron en el experimento. En este paradigma, el requisito para obtener una infusión fue de acuerdo a la siguiente serie: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000 (Richardson y Roberts 1996; Martini y Valverde, 2012). El *breaking point* se define como la última fase completada antes de la extinción de la conducta de auto-administración en una sesión de 2 h. La sesión de PR se prolongó durante 2 horas o hasta que los ratones no completaron la fase para la liberación de un refuerzo en el plazo de 1 h. El *breaking point* de auto-administración se determinó en cada animal, así como también fue calculada la cantidad total de cocaína en miligramos (mg) auto-administrada por cada animal durante los diez días de adquisición.

#### **7.2.5. Análisis estadísticos**

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Se realizó un análisis mixto de varianza (ANOVA) para las medidas de actividad motora previa a la administración de cocaína y otro ANOVA para la respuesta motora a la administración de

## **Estudio 2**

cocaína con una variable intra - Dosis, con cinco niveles (0, 1, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína) - y dos variables entre - Sexo, con dos niveles (machos y hembras), y Pre-Exposición, con dos niveles (control y etanol).

Para el CPL, se analizó el tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga durante el pre y post-condicionamiento por medio de un análisis mixto de varianza (ANOVA) con dos variables entre - Sexo, con dos niveles (machos y hembras), y Pre-Exposición, con dos niveles (control y etanol) - y una variable intra - Días, con dos niveles (Pre-C y Post-C).

Se realizó un ANOVA para analizar las diferencias entre el número de infusiones en la autoadministración de cocaína, con dos variables entre - Sexo, con dos niveles (machos y hembras), y Pre-Exposición, con dos niveles (control y etanol) - y una variable intra - Días con diez niveles; seguido por otro ANOVA para las comparaciones entre *nose-pokes* al agujero activo e inactivo, la media de la ingesta total de cocaína (mg) por grupo, el día medio de adquisición de los criterios, y también se compararon las respuestas obtenidas en el PR.

Las comparaciones post hoc fueron realizadas con la prueba de Bonferroni, y los datos de algunos ANOVAs también fueron sometidos a la prueba post hoc HSD de Tukey, ya que esta prueba no requiere una interacción significativa entre los factores y es muy conservadora contra el error de tipo I (Wilcox , 1987).

Además, las correlaciones de Pearson se realizaron entre las medidas de CPL (puntuación de condicionamiento y tiempo invertido en el compartimento asociado a las droga en la fase de Post-C) y el paradigma de autoadministración (número de infusiones, ingesta en mg y PR).

### **7.2.6. Resultados**

*Experimento 1: Efectos a largo plazo de un consumo intensivo e intermitente de EtOH sobre la respuesta locomotora inducida por diferentes dosis de cocaína.*

El ANOVA para la actividad locomotora registrada previa a la administración del fármaco reveló una disminución significativa en la actividad del primer período (1-10 min) frente a los últimos periodos

## **Estudio 2**

(51-60 min) en todos los grupos experimentales [ $F(1,58)=513.137$ ;  $p<0.0001$ ] (datos no representados).

Los resultados de la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de cocaína se presentan en la Figura 1. El ANOVA para la actividad locomotora posterior a la administración de solución salina o de diferentes dosis de cocaína reveló un efecto significativo de la variable Sexo [ $F(1,52)=4.812$ ;  $p<0.033$ ], lo que demuestra que las hembras fueron más activas que los machos.

Se observó un efecto significativo de la variable Dosis [ $F(4,49)=54.007$ ;  $p<0,0001$ ] y las interacciones Sexo\*Dosis [ $F(4,49)=3.066$ ;  $p<0.025$ ] y Sexo\*Pre-Exposición\*Dosis [ $F(4,49)=2.502$ ;  $p<0.05$ ]. Las diferencias de sexo en ratones previamente expuestos a solución salina solamente se observaron después de la administración de solución salina ( $p<0.001$ ). Sin embargo, se observaron diferencias de sexo en ratones previamente expuestos a EtOH después de la administración de solución salina ( $p<0.001$ ) y cocaína 1 mg/kg ( $p<0.012$ ), 10 mg/kg ( $p<0.045$ ) y 20 mg/kg ( $p<0.05$ ). La dosis de 1 mg/kg de cocaína indujo una mayor actividad en las hembras pre-expuestas a EtOH durante la adolescencia que las pre-tratadas con solución salina ( $p<0.01$ ). Sin embargo, la dosis de 20 mg/kg de cocaína produjo menor actividad en

los machos pre-expuestos a EtOH durante la adolescencia que en los pre-tratados con solución salina ( $p < 0.05$ ).

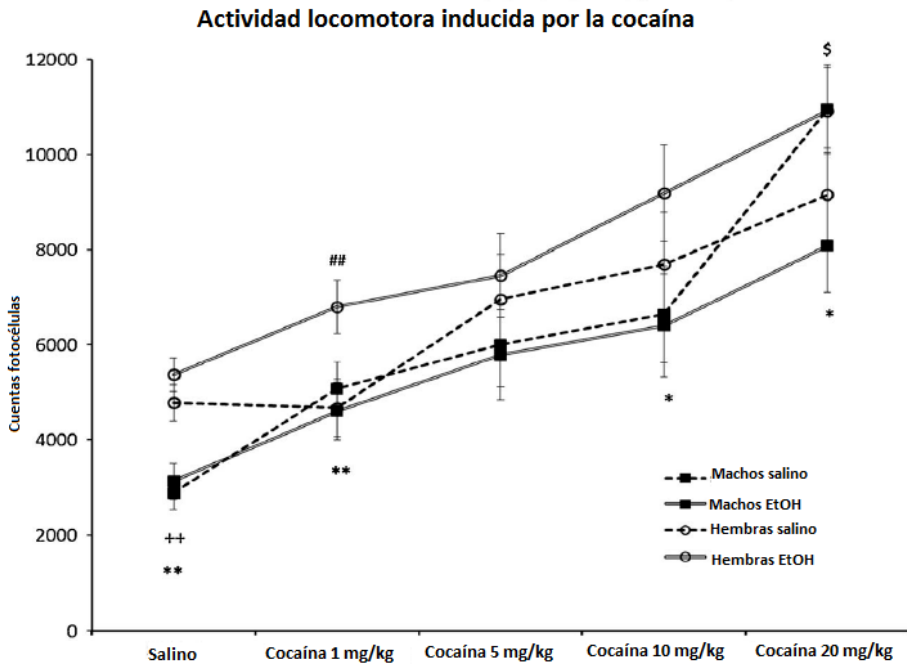


Figura 1. Efectos a largo plazo de un consumo intensivo e intermitente de etanol (EtOH) durante la adolescencia sobre la respuesta locomotora inducida por la administración de diferentes dosis de cocaína (0, 1, 5, 10 y 20 mg/kg). Los datos representan la media ( $\pm$  SEM) de la primera hora tras la administración. ++ $p < 0.01$  machos pre-expuestos a solución salina vs. hembras pre-expuestas a solución salina; \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  machos pre-expuestos a EtOH vs. hembras pre-expuestas a EtOH; ## $p < 0.01$  hembras pre-expuestas a solución salina vs. hembras pre-expuestas a EtOH; \$ $p < 0.01$  machos pre-expuestos a solución salina vs. machos pre-expuestos a EtOH.

## **Estudio 2**

*Experimento 2: Efectos a largo plazo de un consumo intensivo de EtOH en el paradigma de CPL y en la autoadministración intravenosa de cocaína.*

Los resultados del CPL se presentan en la Figura 2. El ANOVA empleado para analizar el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga durante el pre y post-condicionamiento reveló un efecto significativo de la variable Días [ $F(1,45)=38.651$ ;  $p<0.0001$ ] y la interacción Días\*Pre-Exposición [ $F(3,45)=3.878$ ;  $p<0.015$ ]. Sólo los machos y las hembras pre-expuestos a EtOH durante la adolescencia mostraron CPL ( $p<0.01$ ), mientras que los animales pre-expuestos a solución salina (machos y hembras) no lo hicieron.

Los resultados del número de infusiones se presentan en la Figura 3A. El ANOVA realizado con los datos obtenidos en la auto-administración intravenosa de cocaína reveló un efecto significativo de la variable Pre-Exposición [ $F(1,19)=5.908$ ;  $p<0.025$ ], lo que indica un mayor número de infusiones en ratones pre-expuestos al EtOH durante la adolescencia que los pre-expuestos a la solución salina. También se observó un efecto significativo de la variable Días [ $F(9,11)=3.092$ ;  $p<0.041$ ] y las interacciones Días\*Pre-Exposición [ $F(9,11)=2.916$ ;  $p<0.049$ ], Sexo\*Días [ $F(9,11)=2.927$ ;  $p<0.048$ ] y Sexo\*Días\*Pre-exposición [ $F(9,11)=3,089$ ;  $p<0.041$ ].



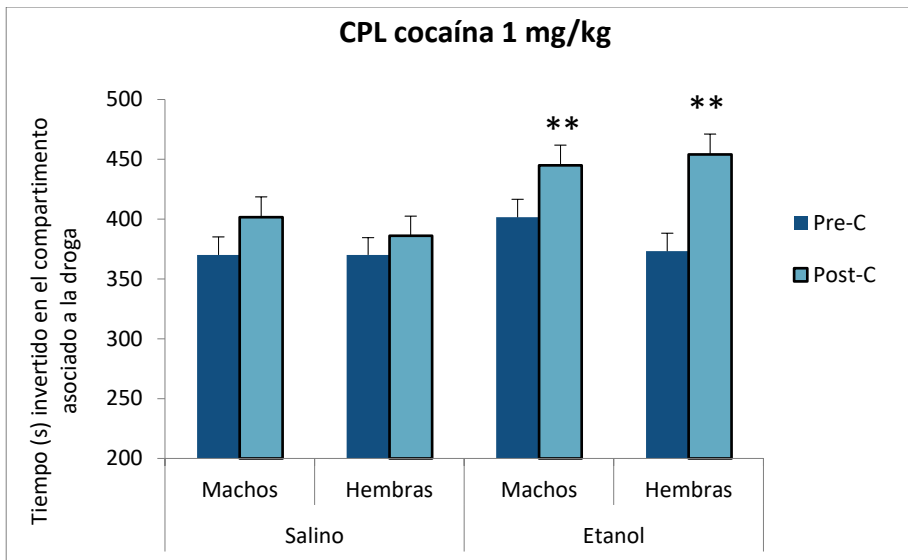


Figura 2. Efectos a largo plazo de un consumo intensivo e intermitente de etanol durante la adolescencia en el CPL inducido por 1 mg/kg de cocaína. Tres semanas después del final del tratamiento previo durante la adolescencia, los ratones adultos fueron condicionados con 1 mg/kg de cocaína. Las barras representan la media ( $\pm$ SEM) del tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga antes de la fase de condicionamiento (azul oscuro) y después (azul claro). \*\* $p < 0.01$  Pre-C vs. Post-C.

La prueba de Bonferroni mostró que las hembras tratadas con EtOH realizan un mayor número de infusiones que las tratadas con solución salina en los días 3, 6, 7 y 8 ( $p < 0.05$ ); mientras que solo se observaron diferencias significativas entre los machos tratados con EtOH o solución salina en el día 10 ( $p < 0.01$ ) (ver Figura 3A).

## Estudio 2

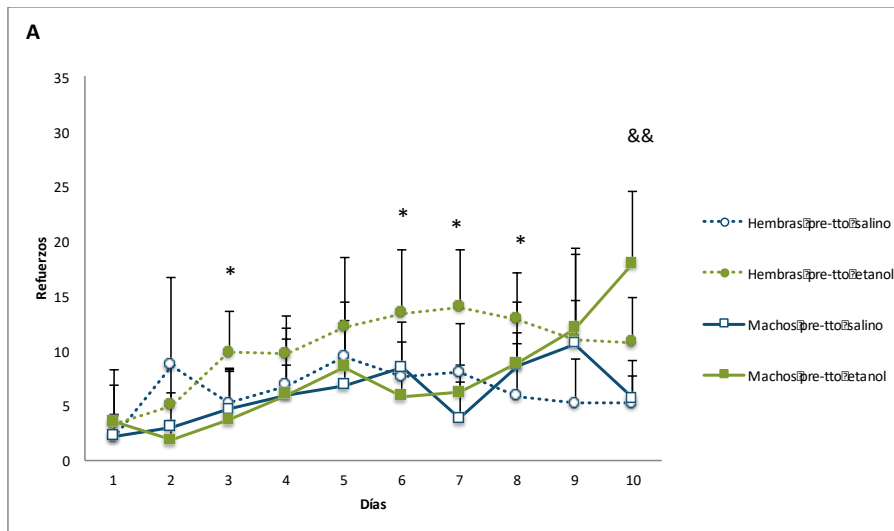
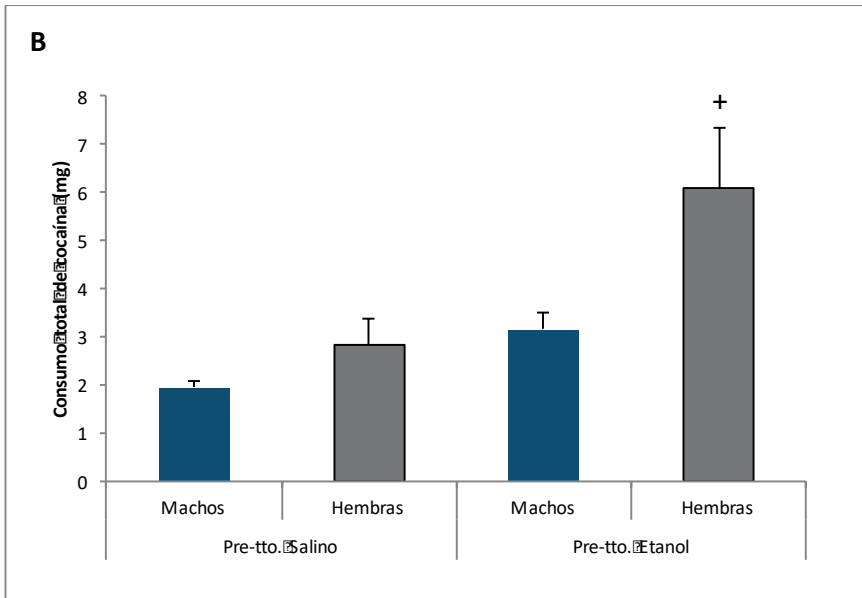


Figura 3. Efectos a largo plazo de un consumo intensivo e intermitente de etanol durante la adolescencia sobre las propiedades reforzantes de la cocaína evaluado con el paradigma de autoadministración intravenosa. Los ratones hembras y machos fueron entrenados diariamente a meter el hocico en el agujero activo con el fin de obtener una inyección de cocaína (1 mg/kg/infusión)

A: Los datos representan el número medio de infusiones  $\pm$  SEM (nose-pokes en el agujero activo seguido de un refuerzo) durante 1 h-diaria. \* $p < 0.05$  hembras pre-expuestas a EtOH vs. hembras pre-expuestas a solución salina; &&  $p < 0.01$  machos pre-expuestos a EtOH vs. machos pre-expuestos a solución salina.



B: Los datos  $\pm$  SEM representan la ingesta media de cocaína en miligramos durante los diez días de la fase de adquisición. + $p < 0.05$  vs. hembras pre-expuestas a solución salina.

El ANOVA realizado para el análisis de la ingesta total de cocaína por cada grupo reveló un efecto significativo de la variable Sexo [ $F(1,23)=4.515$ ,  $p < 0.045$ ], siendo las hembras las que toman más cocaína que los machos, así como un efecto significativo de la variable Pre-Exposición [ $F(1,23)=6.155$ ,  $p < 0.021$ ], con mayor consumo de cocaína entre los ratones pre-tratados con EtOH que los pre-tratados con solución salina. Como mostraron las pruebas post hoc de Tukey,

## **Estudio 2**

se observó en las hembras pre-expuestas a EtOH, que se autoadministraron más cocaína que las hembras pre-expuestas a la solución salina [ $F(3,26)=4.827$ ;  $p<0.01$ ; HSD Tukey:  $p<0.033$ ] (Figura 3B). El ANOVA para evaluar el *breaking point* no mostró diferencias entre grupos [ $F(3,24)=0.838$ , n.s.] en el programa de PR. Además, el ANOVA realizado para analizar el día de adquisición reveló un efecto significativo de la variable Sexo [ $F(1,24)=6.051$ ,  $p<0.021$ ] revelando que las hembras fueron más rápidas que los machos en la adquisición de la respuesta condicionada. Además, las hembras pre-tratadas con EtOH y salino discriminan entre el agujero activo y el inactivo a partir de la tercera sesión ( $p<0.05$ ) (véase la Figura 4A), mientras que los ratones machos pre-tratados con EtOH discriminan a partir del cuarto día de sesión, y los machos pre-tratados con solución salina alcanzaron diferencias significativas en los días 4, 6, 8 y 10 (véase la Figura 4B). Además, el ANOVA realizado para analizar el número de respuestas al agujero activo mostró un efecto significativo de la interacción Sexo\*Días\*Pre-Exposición [ $F(9,11)=2.855$ ;  $p<0.05$ ], que revela un mayor número de respuestas en las hembras pre-expuestas al EtOH que en los machos pre-expuestos al EtOH y en las hembras control en los días 3, 6, 7 y 8 ( $p<0.05$ ). No se detectaron correlaciones de Pearson significativas entre las medidas de los paradigmas de CPL y de autoadministración. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre el número de infusiones y el PR ( $r=0.436$ ;  $p<0.026$ ) y entre la cocaína consumida en mg y el PR ( $r=0.437$ ;  $p<0.026$ ).

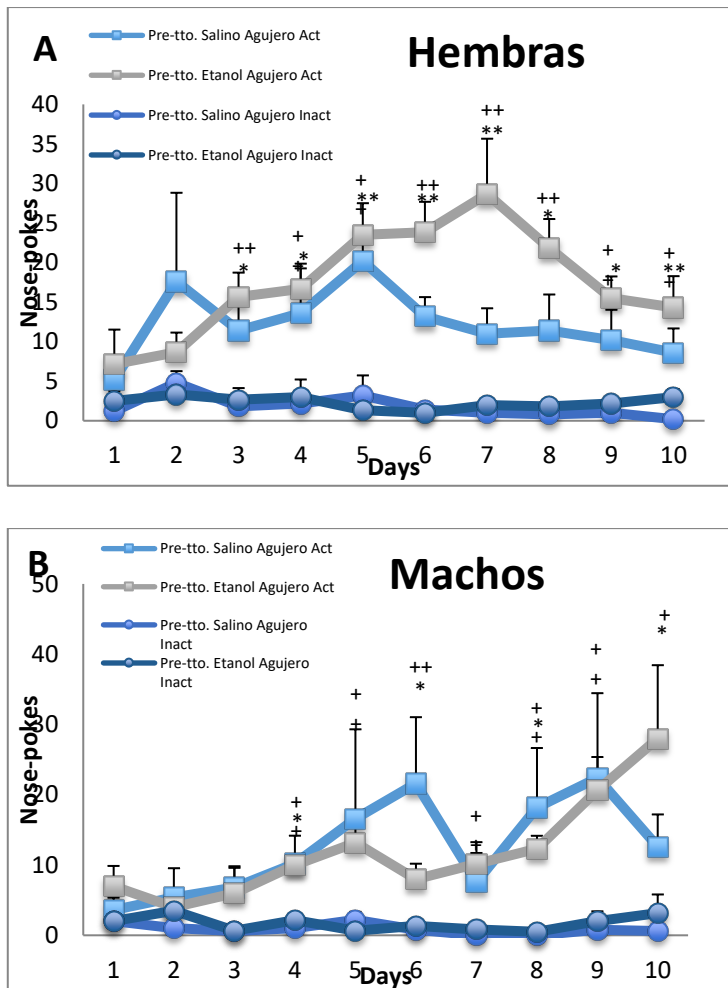


Figura 4. Respuesta de los nose-pokes en el agujero activo (cuadrados) y los agujeros inactivos (círculos) durante la adquisición de la autoadministración de cocaína (1 mg/kg/infusión) en hembras (A) y machos (B). Los datos representan la media de los nose-poke  $\pm$  SEM durante 1-h, todos los días. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  agujero activo pre-expuestos a solución salina vs. agujero inactivo pre-expuestos a solución salina. +  $p < 0.05$  y ++  $p < 0.01$  agujero activo pre-expuestos a EtOH vs agujero inactivo pre-expuestos a EtOH.

## **Estudio 2**

### **7.2.7. Discusión**

El principal objetivo de este estudio fue evaluar los efectos a largo plazo de la exposición intensiva e intermitente de etanol durante la adolescencia sobre el nivel de actividad locomotora y sobre los efectos reforzantes de la cocaína en ratones adultos machos y hembras. Hasta la fecha, este es el primer estudio que evalúa las consecuencias a largo plazo de un *binge* de EtOH durante la adolescencia sobre los efectos de la cocaína en la vida adulta en ambos sexos. Nuestros resultados muestran que la pre-exposición al EtOH durante la adolescencia aumenta la sensibilidad a la cocaína evaluada mediante el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar, así como también muestran un incremento en la autoadministración de cocaína en los ratones adultos, teniendo un efecto diferenciado según el sexo del animal. Además, también se observó una respuesta motora a la cocaína diferente en cada sexo.

La principal aportación que este estudio ofrece es la evidencia de que un *binge* de EtOH administrado durante la adolescencia en ratones hembras produce diferentes efectos a largo plazo a los observados en ratones machos. Aunque los pre-tratados con el vehículo no se condicionaron, tanto los machos como las hembras pre-tratadas con EtOH desarrollaron preferencia con una dosis no efectiva de cocaína

en el paradigma de CPL. Además, las hembras pre-expuestas al EtOH presentaron un mayor consumo de cocaína con respecto a los controles, y un patrón de respuesta más estable en el paradigma de autoadministración intravenosa con respecto a los machos. Las hembras pre-tratadas con EtOH se auto-administraron más cocaína que los otros grupos y a partir del tercer día presentaron un número significativamente mayor de infusiones que las hembras pre-tratadas con salino. Mientras tanto, los machos pre-tratados con EtOH realizaron un número significativamente mayor de infusiones que sus controles sólo en el último día (día 10). Por otra parte, la exposición temprana al EtOH aumentó la respuesta locomotora a la cocaína en las hembras, mientras que por el contrario se observó una reducción de la respuesta en los machos, principalmente a las dosis más altas y más bajas de la droga. Por tanto, estos resultados demuestran que un *binge* de alcohol administrado durante la adolescencia afecta de manera diferente a hembras y a machos.

Por tanto, los ratones pre-tratados con EtOH durante la adolescencia (PND 26-39) mostraron una mayor sensibilidad a las propiedades reforzantes de la cocaína en la edad adulta, dado que sólo el grupo de animales pre-tratados desarrolló preferencia en el CPL inducido por una dosis sub-umbral de cocaína (1 mg/kg). Estos resultados son afines a estudios previos realizados por nuestro laboratorio, los cuales han demostrado que los ratones, de acuerdo con su alto nivel de búsqueda

## **Estudio 2**

de la novedad, se muestran más vulnerables a la adicción a las drogas, adquiriendo preferencia con esta dosis baja de cocaína (Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014; Mateos-García y cols., 2015). Estudios recientes con cocaína y otras drogas de abuso muestran que la exposición temprana al EtOH aumenta la sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas en la vida adulta (Do Couto y cols., 2011; Hutchison y Riley, 2012; Molet y cols., 2013.; Montagud-Romero y cols., 2014). La dosis de 5 mg/kg de cocaína indujo un CPL significativo sólo en ratones machos adultos que habían sido pre-expuestos al EtOH a lo largo de 5 días durante la adolescencia (dos administraciones diarias de 2.5 g/kg en el PND 28-32) (Molet y cols., 2013). De la misma manera, una exposición temprana al etanol (2 g/kg/día durante 10 días, PND 30-39) produjo una sensibilización a los efectos reforzantes condicionados de la cocaína sobre el CPL en ratas machos adultas (Hutchison y Riley, 2012). En otro estudio, solo los ratones machos adultos previamente expuestos durante la adolescencia, con el mismo patrón de *binge* que el utilizado en el presente trabajo, adquirieron CPL con 1 mg/kg de cocaína (Montagud-Romero y cols., 2014). En el presente estudio, además de una mayor sensibilidad a las propiedades reforzantes de la cocaína en el CPL, los animales pre-tratados con EtOH durante la adolescencia presentaron un mayor consumo de cocaína en el paradigma de auto-administración por vía intravenosa. En la edad adulta, los ratones pre-expuestos al EtOH realizaron un mayor número de infusiones y, por tanto, una mayor ingesta de cocaína que los



animales controles. El CPL y la auto-administración son los paradigmas más utilizados para la evaluación de los efectos reforzantes de la cocaína (Tzschentke, 1998; 2007; Aguilar y cols., 2009). Por lo tanto, pensamos que sería de gran interés evaluar si la exposición al etanol durante la adolescencia aumenta los efectos reforzantes condicionados de la cocaína, y también observar si aumenta el consumo de cocaína en el paradigma de auto-administración. Así, someter a los mismos animales a los dos paradigmas nos ofrece la oportunidad de comparar los efectos motivacionales de las drogas en ambos modelos animales, aunque implique algunas limitaciones con respecto a la interpretación de los resultados. Dado que el mismo grupo de ratones fue utilizado tanto en el CPL y como en el paradigma de auto-administración, se puede suponer que la administración de cocaína durante la adquisición de CPL (1 mg/kg/día durante 4 días) sensibilizó la autoadministración subsiguiente. Todos los animales, ya sea pre-expuestos durante la adolescencia a la solución salina o al etanol, recibieron el mismo número de inyecciones de cocaína en el CPL; sin embargo, los pre-expuestos a etanol mostraron una ingesta significativamente mayor de autoadministración de cocaína que los pre-expuestos a la solución salina. Por tanto, es posible que la exposición al alcohol durante la adolescencia haya tenido un impacto en el grado de sensibilización a la cocaína recibida durante el CPL, y puede haber provocado un efecto diferencial sobre la autoadministración de la droga. Otra posible explicación para estos

## ***Estudio 2***

resultados es que la exposición a etanol durante la adolescencia podría haber atenuando los efectos aversivos de la cocaína en ratones adultos, lo que lleva a un aumento en la auto-administración de la droga. Se ha demostrado que la exposición a etanol en adolescentes atenúa los efectos de aversivos de la cocaína en ratones adultos (Hutchison y cols., 2010), y estudios recientes han demostrado que el consumo de drogas depende del equilibrio entre los efectos reforzantes y aversivos, así los animales que fueron menos sensibles a los efectos aversivos del fármaco, exhibiendo mayores niveles de auto-administración de drogas (Verendeev y Riley, 2012; 2013). En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el importante papel que una exposición temprana al alcohol puede desempeñar en el desarrollo del abuso de la cocaína en la edad adulta.

Por otro lado, aunque el grupo expuesto a EtOH durante la adolescencia mostró tanto una mayor sensibilidad a los efectos condicionados reforzantes de la cocaína en el CPL como una mayor autoadministración de cocaína que el grupo pre-expuesto a solución salina, no se detectó ninguna correlación estadística significativa entre las medidas de CPL (nivel de condicionamiento y tiempo invertido en el compartimento asociado a las droga en el Post-C) y la auto-administración (número de infusiones e ingesta en mg). Estos datos nos llevan a concluir que los dos paradigmas empleados en este trabajo evalúan aspectos independientes de los efectos reforzantes de

la droga, como se indica en la literatura (Tzschentke, 1998, 2007; Aguilar y cols., 2009). Los paradigmas de CPL y auto-administración evalúan distintos aspectos de la recompensa y, por lo tanto, diferentes características del comportamiento adictivo. La autoadministración implica un condicionamiento operante, es un modelo de consumo de drogas y evalúa las propiedades reforzantes primarias de las drogas, mientras que el CPL implica un condicionamiento pavloviano, por lo que es un modelo de consumo de drogas asociado a las claves ambientales y evalúa el valor del incentivo de las claves asociadas con la droga para el mantenimiento de la conducta adictiva.

Sin embargo, la falta de diferencias en el PR en la respuesta a la cocaína parece sugerir que la exposición al EtOH durante la adolescencia no altera la motivación por la cocaína como reforzador, en contraste con la que se muestra en un estudio previo (Alaux-Cantin y cols., 2013), donde informaron que las intoxicaciones intermitentes de EtOH durante la adolescencia temprana incrementan la motivación por el EtOH en el paradigma de autoadministración. Sin embargo, consideramos que la mencionada falta de diferencias en nuestro estudio podría ser debido al número de sesiones de evaluación: tan sólo 10 días en contraste con las 5 semanas evaluadas por Alaux-Cantin y cols. (2013). Por otra parte, las correlaciones positivas observadas entre el número de infusiones y el PR y entre la cocaína mg y el PR indican que los animales que llevan a cabo un mayor número

## ***Estudio 2***

de infusiones y un mayor consumo de cocaína presentan un mayor PR. Dado que nuestros datos muestran claramente un mayor consumo de cocaína en ratones previamente expuestos al etanol que en los pre-expuestos a la solución salina, podría interpretarse como una mayor motivación hacia la cocaína. Por otra parte y en contraste con nuestros resultados, en el estudio mencionado, diversas intoxicaciones intermitentes de EtOH durante la adolescencia no alteraron el CPL inducido por anfetamina (Alaux-Cantin y cols., 2013.), posiblemente debido a que las dosis empleadas fueron también eficaces para inducir CPL en ratas que no habían sido pre-expuestas al EtOH. En el presente estudio, por contra, se utilizó una dosis sub-umbral de cocaína, que fue ineficaz para inducir CPL en ratones que no habían sido pre-expuestos al EtOH. Los cambios observados en los efectos reforzantes de la cocaína en ratones pre-expuestos al EtOH en estudios anteriores y en el actual, podrían estar relacionados con el impacto del EtOH durante la adolescencia en el sistema de neurotransmisión dopaminérgica (receptores D1 y D2 y sus vías de transducción), críticos durante la maduración a lo largo de la adolescencia (Tarazi y Baldessarini, 2000). De hecho, se han registrado niveles elevados de DA en el NAcc en ratas expuestas a EtOH durante la adolescencia (Badanich y cols., 2007; Pascual y cols., 2009; Philpot y cols., 2009). Además, nuestros resultados también confirmaron que las hembras adquirieron los criterios de autoadministración de cocaína más rápido

que los machos, de acuerdo con otros estudios en ratas (Carroll y cols., 2002; Lynch y Carroll 1999) y ratones (Martini, 2014).

En el presente estudio, la pre-exposición al EtOH durante la adolescencia altera la reactividad motora a la cocaína de una manera sexo-dependiente en los ratones adultos. Hemos observado un ligero efecto a largo plazo de la exposición temprana al EtOH en la respuesta motora, que varía en función del sexo. Sólo hubo tendencia de la pre-exposición al EtOH para aumentar la respuesta motora a la cocaína en las hembras, significativa a dosis bajas. Por el contrario, los machos pre-expuestos al EtOH mostraron una respuesta reducida a la cocaína con la dosis más alta. Además, entre los ratones pre-expuestos al EtOH, las hembras presentan una respuesta motora más elevada para la mayoría de las dosis de cocaína que los machos. De acuerdo con nuestros resultados, se ha observado que las ratas machos pre-tratadas con EtOH durante la adolescencia exhiben una disminución en la actividad locomotora en respuesta a la cocaína durante la edad adulta (Hutchinson y cols., 2010); sin embargo, hasta donde sabemos no hay datos disponibles sobre los efectos a largo plazo de la exposición temprana al EtOH en la respuesta motora posterior a la cocaína en las hembras. Por otra parte, nuestros resultados confirman que las hembras muestran más actividad locomotora que los machos, lo cual está en consonancia con estudios previos (Dalla y Shors, 2009; Navarro-Frances y Arenas, 2014). Por otra parte, también se verifica

## **Estudio 2**

que la pre-exposición temprana al EtOH no altera la habituación motora en un entorno novedoso, ya que en todos los grupos experimentales los ratones disminuyeron significativamente su actividad espontánea durante el periodo de habituación 60 min antes de la administración del fármaco.

A pesar de las escasas investigaciones hasta la fecha, hay evidencia de los efectos a largo plazo de la exposición al EtOH durante la adolescencia, dato remarcable, ya que el consumo de alcohol suele iniciarse durante este periodo de desarrollo (Spear y Swartzwelder, 2014). La exposición al EtOH tipo *binge* durante la adolescencia altera las funciones de recompensa del cerebro adulto en respuesta a la administración aguda de EtOH, aumentando la ingesta y la motivación por el EtOH en el paradigma de autoadministración, así como también se ha observado una reducción tanto de las propiedades aversivas como gratificantes del EtOH (Alaux-Cantin y cols., 2013; Boutros y cols., 2014). Aunque es sabido que la progresión hacia el consumo de drogas ilícitas entre humanos se asocia con el uso previo de alcohol, pocos estudios han explorado las consecuencias de la exposición al EtOH durante la adolescencia sobre los efectos reforzantes de otras drogas, incluyendo la cocaína, así como la mayoría de investigaciones tampoco se han centrado en la respuesta del sexo femenino (Kandel y cols., 1992; Crews y cols., 2007). Se sabe que las mujeres son más sensibles a los efectos de los psicoestimulantes y presentan una

progresión más rápida del uso inicial a la adicción a las drogas, en comparación a los hombres (Anker y Carroll, 2011; Becker y Hu, 2008). Los presentes resultados confirman todo ello, así como también revelan que la exposición al EtOH durante un período de desarrollo tal como es la adolescencia puede incrementar esta tendencia. Estudios futuros deberán evaluar la exposición temprana de EtOH en ratones machos y hembras utilizando un enfoque de dosis-respuesta a la administración de cocaína en los paradigmas de CPL y auto-administración; de esta manera, podrían ser confirmadas las alteraciones en la sensibilidad a los efectos reforzantes condicionados a la cocaína observados en las ratas machos adultas (Hutchinson y Riley, 2012). Por otra parte, en futuros estudios sería de interés determinar si la exposición al EtOH durante la edad adulta también induce un aumento de la vulnerabilidad a la cocaína. En conclusión, nuestros datos confirman que la exposición al alcohol en adolescentes tiene consecuencias a largo plazo, y altera múltiples efectos de la cocaína incluyendo su respuesta motora inducida y sus propiedades reforzantes. En concreto, nuestro estudio revela por primera vez que la exposición intermitente a etanol durante la adolescencia aumenta, de una manera sexo-dependiente, la ingesta y sensibilidad a la cocaína en la edad adulta.





## Sex differences in the long-lasting consequences of adolescent ethanol exposure for the rewarding effects of cocaine in mice

A. Mateos-García<sup>1</sup> · C. Manzanedo<sup>1</sup> · M. Rodríguez-Arias<sup>1</sup> ·  
M. A. Aguilar<sup>1</sup> · E. Reig-Sanchis<sup>1</sup> · C. I. Navarro-Francés<sup>1</sup> ·  
O. Valverde<sup>2</sup> · J. Miñarro<sup>1</sup> · M. C. Arenas<sup>1</sup>

Received: 31 October 2014 / Accepted: 7 April 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

### Abstract

**Rationale** The practice of binge drinking is very common among adolescents of both sexes. It can have long-term consequences with respect to drug consumption during adulthood, but knowledge on these effects in females is limited.

**Objectives** The long-lasting effects of intermittent exposure to ethanol (EtOH) during adolescence on different cocaine-elicited behaviours, including locomotor reactivity, conditioned place preference (CPP) and intravenous self-administration, were evaluated in male and female adult mice. It was hypothesized that an EtOH binge during adolescence would increase sensitivity to the effects of a sub-threshold dose of cocaine and has a differential impact on the drug's effects in males and females.

**Methods** Adolescent OF1 mice (postnatal day (PND) 26) underwent a 2-week pre-treatment schedule consisting of 16 doses of EtOH (2.5 g/kg) or saline (twice daily administrations separated by a 4-h interval i.p.) administered on two consecutive days separated by an interval of 2 days. Three weeks later (PND>60), we assessed locomotor activity responses induced by an acute injection of different doses of cocaine in experiment 1 and the rewarding effects of cocaine on the CPP (1 mg/kg) and intravenous self-administration (1 mg/kg/infusion) paradigms in experiment 2.

**Results** Pre-exposure to EtOH during adolescence altered motor reactivity to cocaine in a dose- and sex-dependent manner, increased sensitivity to cocaine in CPP and enhanced self-administration in adult mice.

**Conclusions** The effects of intermittent exposure to ethanol during adolescence are evident in adulthood, during which greater sensitivity and intake of cocaine is observed and differ in each sex.

**Keywords** Sex differences · Ethanol · Cocaine · Binge drinking · Adolescence · CPP · Intravenous self-administration · Mice

### Introduction

Alcohol is the most consumed drug among adolescents, with 75 to 82 % of students (14 to 18 years old) reporting alcohol use, 45.5 % binge drinking in the last year (ESTUDES 2013) and 29.2 % reporting binge drinking in the past month (Centers for Disease Control 2013). The percentage of adolescents indulging in this intensive and intermittent pattern of drinking alcohol gradually increases with age and is similar to several countries (Hibell et al. 2011; Degenhardt et al. 2013; Johnston et al. 2013). A "binge" has been defined as a pattern of drinking alcohol that brings blood alcohol concentration to 0.08 grams percent or above; this translates to five or more drinks or four or more drinks in about 2 h in the case of a typical male and female adult, respectively (NIAAA 2004). Binge drinking is highly prevalent in both genders but is even higher among girls than boys in the 14–16-year-old group in some countries (Hibell et al. 2011; ESTUDES 2013). Whereas 3.3 % of adolescents (14–18 years) consume cocaine while binge drinking, only 0.4 % of teenagers use cocaine without having binge drunk (ESTUDES 2013). Furthermore, adult

✉ M. C. Arenas  
carmen.arenas@uv.es

<sup>1</sup> Unidad de investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de València, Avda. Blasco Ibañez, 21, 46010 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Grup de Recerca en Neurobiologia del Comportament, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

addicts to cocaine report earlier alcohol consumption than non-addicts (15.5 vs. 18.1 years) (Arias et al. 2013). These data suggest that the consumption of alcohol, especially of an intensive manner, is associated with a higher prevalence of use of other drugs, including cocaine.

Adolescence is a critical developmental period for addictive diseases. The brain is one of the major targets of the actions of ethanol (EtOH), and heavy alcohol consumption produces significant alterations of the structure, physiology and function of this organ (Harper and Matsumoto 2005). Recent studies have demonstrated that heavy drinking during a period of brain maturation, such as adolescence, can have a negative impact on brain structure and function, causing significant short- and long-term cognitive and behavioural consequences (Alfonso-Loeches and Guerri 2011). Indeed, these damaging effects of EtOH are usually irreversible (Guerri 2002). Episodic alcohol intoxication or binge-type administration of alcohol to adolescent experimental animals increases cell death in the neocortex, hippocampus and cerebellum (Pascual et al. 2007; McClain et al. 2014). Moreover, EtOH induces higher levels of dopamine (DA) release in juvenile rats than in adult paired controls (Pascual et al. 2009). These effects could explain why adolescent animals are more sensitive than adults to some of its pleasurable effects, including social facilitation (Varlinskaya and Spear 2002), but are less sensitive to the negative consequences of alcohol on motor impairment (Spear and Varlinskaya 2005) or in terms of hangover effects (Doremus et al. 2003). Interestingly, DA levels increased by EtOH exposure during adolescence remain high throughout adulthood (Badanich et al. 2007). These changes could contribute to the enhanced vulnerability to drug abuse and addiction reported in people who have had an early contact with drugs of abuse including alcohol (Witthen et al. 2008).

It is known that early alcohol use correlates with an increased likelihood of abusive alcohol use in adulthood (Grant et al. 2001; Hingson et al. 2006; Cable and Sacker 2008; Molet et al. 2012; Quoilin et al. 2014; Varlinskaya et al. 2014). However, the consequences of juvenile EtOH exposure on the probability of abusing other drugs later in life have been less studied and are still unclear. Studies in our laboratory and by other groups have shown that exposure to alcohol during adolescence increases the reinforcing effects of other drugs of abuse (Do Couto et al. 2011; Hutchison and Riley 2012; Molet et al. 2013; Montagud-Romero et al. 2014). Specifically, adolescent exposure to EtOH altered the spontaneous behaviours of mice in adult life (Rodríguez-Arias et al. 2011; Montagud-Romero et al. 2014), increased sensitivity to the conditioned rewarding effects of MDMA and cocaine (Do Couto et al. 2011; Hutchison and Riley 2012; Molet et al. 2013; Montagud-Romero et al. 2014), attenuated the aversive effects of cocaine (Hutchison et al. 2010) and modified brain monoamine levels (Do Couto et al. 2011; Rodríguez-Arias et al. 2011). Additionally, these long-lasting effects were

modulated by the novelty-seeking phenotype of the animals (Montagud-Romero et al. 2014).

The above-mentioned studies evaluated adolescent exposure to EtOH in male animals; however, sex differences have been reported in the long-term effects of adolescent alcohol consumption on brain structure (Koss et al. 2012) and on alcohol's aversive properties (Sherrill et al. 2011a). For example, in the adult medial prefrontal cortex, binge administration of EtOH during adolescence resulted in a decreased number of glia cells in males, while no changes were observed in females, possibly due to a decrease in their proliferation (Koss et al. 2012). EtOH pre-exposure during adolescence decreased EtOH-induced conditioned taste aversion in adult male rats but not in females (Sherrill et al. 2011a), though these sex differences were not observed if females were ovariectomized before puberty (Sherrill et al. 2011b).

A previous study has reported that exposure to ethanol during adolescence sensitized the conditioned rewarding effects of cocaine in adult male rats, producing a leftward shift of the cocaine dose-response curve (Hutchison and Riley 2012). Therefore, the present study was designed to evaluate the long-term effects of exposure to EtOH during adolescence in a binge pattern on sensitivity to cocaine in both sexes in adulthood. This is the first time this has been done. With this purpose in mind, adolescent mice received a pre-treatment with EtOH using a validated model of binge-like EtOH exposure in adolescent rodents (Pascual et al. 2007, 2009, 2012; Rodríguez-Arias et al. 2011). Furthermore, the used dose (2.5 g/kg) induces a blood ethanol concentration similar to those achieved by an adolescent human through binge drinking (Rodríguez-Arias et al. 2011; Roger-Sanchez et al. 2012). Three weeks after the last EtOH administration, the then adult mice were evaluated in the three paradigms that are most commonly used to assess the action of cocaine in animals: cocaine-induced locomotor activity, conditioned place preference (CPP) and intravenous self-administration. In experiment 1, we assessed the locomotor activity response induced by different acute doses of cocaine in adult mice pre-exposed to EtOH or a vehicle during adolescence. In experiment 2, another set of mice pre-exposed to EtOH or the vehicle was evaluated first in the CPP induced by a sub-threshold dose of cocaine and later in the operant cocaine intravenous self-administration paradigm. We hypothesized that an EtOH binge during adolescence would have a differential impact on the cocaine effects of male and female adult mice.

## Materials and methods

### Subjects

A total of 62 (31 male and 31 female) mice of the OF1 strain (Charles River, Barcelona, Spain) were employed in experiment

1 and 49 (24 male and 25 female) mice of the same strain in experiments 2 and 3. The animals arrived at the laboratory at postnatal day (PND) 21 and were all housed in groups of four in plastic cages (28 cm length×28 cm width×14.5 cm height) under the following conditions: constant temperature ( $21\pm 2$  °C), a relative humidity of 60 %, a 12 h light cycle not reverted (lights on from 8:00 to 20:00) and food and water available ad libitum (except during behavioural tests). All animals in the same cage were assigned to an equal pre-exposure condition during adolescence. Given that it was not an aim of the present study to examine hormonal regulation of the long-term effects of exposure to EtOH during adolescence, oestrous cycles were not controlled or monitored, though it is necessary to bear in mind that all behavioural tests lasted 4–5 days, which is the length of the oestrous cycle in rodents. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the council of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The Animal Use and Care Committee of the University of Valencia approved the present study.

#### Drugs

Ethanol (EtOH) was diluted in physiological saline (0.9 % NaCl) at a volume of 0.02 ml/g and administered i.p. in a concentration of 2.5 g/kg/dose. Cocaine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber, Spain) was diluted in physiological saline (0.9 % NaCl) and, according to experimental procedure, administered i.p. at a volume of 0.01 ml/g in CPP or i.v. in a volume of 23.5  $\mu$ l in the self-administration paradigms.

#### Apparatus

Locomotor activity responses induced by an acute injection of cocaine or vehicle were automatically measured by an actimeter (Cibertec S.A., Spain) consisting of eight cages ( $33\times 15\times 13$  cm), each with eight infrared lights located in a frame around the cage. Beams were placed 2 cm apart and were positioned on the horizontal axis 1.6 cm from floor level (body level of the mice). The different frames were 4 cm apart and, since they were opaque, prevented animals from seeing their conspecifics.

For CPP, we employed eight identical Plexiglas boxes with two equal-sized compartments (30.7 cm length×31.5 cm width×34.5 cm height) separated by a grey central area (13.8 cm length×31.5 cm width×34.5 cm height). The compartments had different coloured walls (black vs. white) and distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one). Four infrared light beams in each compartment of the box and six in the central area allowed the position of the animal and its crossings from one compartment to the other to be recorded. The equipment was controlled by two IBM PC computers using MONPRE 2Z software (Cibertec S.A., Spain).

Self-administration experiments were conducted in five mouse operant chambers (Model ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, VT, USA) equipped with two holes, one of which was selected as an active hole for delivering the reinforcer and the other as an inactive hole. Nose poking through the active hole delivered a reinforcer (cocaine infusion), while nose poking through the inactive hole had no consequences. For half of the animals, the right hole was active and the left hole inactive, while the opposite was the case for the other half of the animals. The chambers were contained inside sound- and light-attenuated boxes equipped with fans to provide ventilation and ambient noise. A stimulus light located above the active hole was paired contingently with delivery of the reinforcer. When mice responded to the active hole, the stimulus light came on and a drug infusion was delivered. Cocaine was infused via a syringe mounted on a microinfusion pump (PHM-100A, MED Associates, Inc., Georgia, VT, USA) and connected via Tygon tubing (0.96 mm o.d., Portex Fine Bore Polythene Tubing, Portex Limited, Hythe, Kent, UK) to a single channel liquid swivel (375/25, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) and to intravenous (i.v.) catheters. The swivel was mounted on a counterbalanced arm above the operant chamber.

#### Experimental design and procedures

##### Drug pre-exposure procedure

An overall and more detailed description of the experimental procedure of each experiment is provided in Table 1.

In both experiments, after an acclimatisation period of 5 days (PND 26), adolescent animals received 16 doses of EtOH (2.5 g/kg) or saline over a 2-week period according to the following schedule: twice daily administrations (with a 4-h interval) on two consecutive days separated by an interval of 2 days during which no injections were administered. Animals were injected on PND 26, 27, 30, 31, 34, 35, 38 and 39. In this way, drug administrations simulated a binge pattern like that indulged in by human adolescents and young adults (Pascual et al. 2012; Rodríguez-Arias et al. 2011). The i.p. route was chosen in order to ensure that all animals received the same amount of EtOH; in addition, this administration accelerates the process of absorption and is less stressful for the animals than forced oral administration. Behavioural tests were performed 3 weeks after pre-exposure to EtOH had finalized, when mice were now adults (since PND 60).

##### Experiment 1: long-term effects of an EtOH binge on locomotor activity responses induced by cocaine

The following experimental groups were established according to the treatment received during adolescence: EtOH pre-treated



**Table 1** Experimental design

Drug pre-exposure:						
PND	21	26–27	30–31	34–35	38–39	
	Arrival	Pre-exposure to ethanol/saline	Pre-exposure to ethanol/saline	Pre-exposure to ethanol/saline	Pre-exposure to ethanol/saline	
		First dose: 9 h	First dose: 9 h	First dose: 9 h	First dose: 9 h	
		Second dose: 13 h	Second dose: 13 h	Second dose: 13 h	Second dose: 13 h	
(A) Experiment 1: locomotor activity response						
PND	40–59	60–64	67–70	74–77	81–84	88–91
	No treatment	Saline administration	Cocaine administration	Cocaine administration	Cocaine administration	Cocaine administration
	All animals	All animals	Group A: 1 mg/kg	Group A: 5 mg/kg	Group A: 10 mg/kg	Group A: 20 mg/kg
			Group B: 5 mg/kg	Group B: 10 mg/kg	Group B: 20 mg/kg	Group B: 1 mg/kg
			Group C: 10 mg/kg	Group C: 20 mg/kg	Group C: 1 mg/kg	Group C: 5 mg/kg
			Group D: 20 mg/kg	Group D: 1 mg/kg	Group D: 5 mg/kg	Group D: 10 mg/kg
(B) Experiment 2: CPP and intravenous self-administration						
PND	60–62	63–66	67	134–162	137–175	
	CPP: Pre-C	CPP: conditioning	CPP: Post-C	Surgery	Self-administration	

males,  $n=15$ ; saline pre-treated males,  $n=16$ ; EtOH pre-treated females,  $n=16$  and saline pre-treated females,  $n=15$ .

Three weeks later, all animals pre-treated during adolescence received a different dose of cocaine (0, 1, 5, 10 or 20 mg/kg, i.p.) in each weekly session (PND 60–91) according to a Latin square design to counterbalance the order of the administration of the doses (Zeelenberg and Pecher 2015) (see Table 1 for more information). The experimental room was illuminated with a dim light (22 W, 1080 ml), and the apparatus was cleaned with water between subjects. Mice were habituated to the locomotor cages for 60 min; immediately afterwards, mice were injected with cocaine and their locomotor activity recorded over the following 60 min to evaluate their cocaine-induced activity response. The values of the photocell counts were registered every minute during both adaptation and cocaine reactivity phases.

**Experiment 2: long-term effects of an EtOH binge in the CPP paradigm and on intravenous self-administration of cocaine**

The following experimental groups were established according to the treatment received during adolescence: EtOH pre-treated males,  $n=12$ ; saline pre-treated males,  $n=12$ ; EtOH pre-treated females,  $n=12$  and saline pre-treated females,  $n=13$ . Three weeks later, all the animals were conditioned with 1 mg/kg of cocaine. Subsequently, all mice underwent the self-administration procedure.

**CPP procedure**

The procedure, unbiased in terms of initial spontaneous preference, was performed as described previously (Manzanedo et al. 2001). To summarize, animals were handled briefly on

each of the 3 days preceding initiation of the CPP, which consisted of three phases that took place during the light cycle. In the first phase, the animals were allowed access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) per day on three consecutive days. On day 3, the time spent by an animal in each compartment during a period of 900 s was recorded. In each group, half the animals received the drug or vehicle in one compartment and the other half in the other compartment. After assigning the compartments, an analysis of variance revealed no significant difference between the time spent in the drug-paired vs. vehicle-paired compartments during the pre-conditioning (Pre-C) phase (PND 60–62). In the second phase (conditioning), animals were conditioned with cocaine through four pairings with the respective compartment. Animals treated with cocaine underwent two pairings per day on PND 63, 64, 65 and 66, receiving an injection of physiological saline immediately before being confined to the vehicle-paired compartment for 30 min and receiving an injection of cocaine (1 mg/kg) after an interval of 4 h, immediately before confinement to the drug-paired compartment for 30 min. The central area was made inaccessible during conditioning by lowering the guillotine doors. During the third phase, or post-conditioning (Post-C), which took place on PND 67, the guillotine doors separating the two compartments were removed and the time spent by the untreated mice in each compartment during a period of 900 s was recorded. The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and the time spent in the same compartment in the Pre-C test (conditioned score) is considered to be a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive, then the drug has induced a preference for the drug-paired compartment, whereas the opposite indicates the development of an aversion.

**Drug self-administration procedure**

Mice were anaesthetized under isoflurane anaesthesia (1.5–2.0 %) and then implanted with intravenous silastic catheters (Soria et al. 2005). They were pre-treated with buprenorphine 0.5 mg/kg (Buprex Schering-Plough S.A., Spain) and meloxicam 2 mg/kg (Metacam Boehringer Ingelheim S.A., Spain) subcutaneously for analgesia and received cefazoline 50 mg/ml (Laboratorios Normon S.A., Spain) i.v. immediately after surgery. In short, a 6-cm-long silastic tubing (0.3 mm inner diameter, 0.6 mm outer diameter) (Silastic®, Dow Corning, Houdeng-Goegnies, Belgium) was fitted to a 22-gauge steel cannula (Semat, Herts, UK) that was bent at a right angle and then embedded in a cement disk (Dentalon Plus, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) with an underlying nylon mesh. The catheter tubing was inserted 1 cm into the right jugular vein and anchored with suture. The remaining tubing ran subcutaneously to the cannula, which exited at the midscapular region. All incisions were sutured and coated with antibiotic ointment (Plasimine 20 mg/g, GlaxoSmithKline, S.A., Madrid, Spain). After surgery, animals were housed individually and allowed to recover for 2–3 days before initiation of the self-administration sessions. The patency of intravenous catheters was evaluated whenever drug self-administration behaviour appeared to deviate dramatically from that observed previously under infusion of 0.1 ml tiobarbital 5 mg/ml (Braun VetCare S.A. Spain) through the catheter. If prominent signs of anaesthesia were not apparent within 3 s of infusion, the mouse was removed from the experiment. The patency of the catheters was evaluated again at the end of the experiment; if the result was negative, the mouse and its corresponding data were removed from the experiment.

Cocaine self-administration sessions (PND 137–175) were conducted 2–3 days after surgery. Mice were trained in the operant chambers to nose poke for cocaine infusions (1 mg/kg/infusion) over a 10-day period. The dose of 1 mg/kg per infusion of cocaine was chosen based on previous studies (Soria et al. 2005; Martini and Valverde 2012; Martini et al. 2014), and the same dose was used for the progressive ratio (PR) schedule of reinforcement. Mice were transported to the dimly lit behavioural test room 15 min prior to testing. Self-administration sessions (1 h daily) began with a priming injection of the drug and a 6 s light cue (located above the reinforced hole) and were conducted 7 days per week. After each session, the mice were returned to their home cages. Prior to these 10 days, on day 0, animals spent 1 h in the operant chamber and received six priming infusions paired with the light cue at the active hole. The objective of this preliminary session was to facilitate future learning processes. The house light was on for 3 s at the beginning of the session and off during the rest of the session. Nose poking at the active hole led to cocaine infusion and activation of the light cue for 6 s.

Mice were trained to nose poke for cocaine under a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement so that one nose poke in the active hole resulted in an infusion of 23.5  $\mu$ l of cocaine over 2 s, while nose poking in the inactive hole had no consequences. A 15-s time-out period was established after each reinforcement. During this 15-s period, the cue light was off and no reward was provided at the active hole. Once the time-out period had finished, the drug was made available again without a cue to signal the regained availability. Responses to the inactive hole and any other responses during the 15-s time-out period were also recorded. The session terminated after 50 reinforcements were delivered or after 1 h, depending on which occurred first.

Mice were considered to have acquired self-administration when the following three criteria were fulfilled: At least 70 % of the total number of responses were executed at the active hole; the number of reinforced responses at the active hole was at least six; and the mean deviation of the total number of reinforcements earned in three consecutive sessions was less than 30 % (70 % stability). The percentage of animals that met the acquisition criteria was 71 %, and the mean time to fulfill said criteria was 6 $\pm$ 2 days (males: 7 $\pm$ 2 and females: 5 $\pm$ 2 days).

After 10 days of acquisition, the reinforcement schedule was changed to PR and only the animals that had met the three acquisition criteria throughout this phase continued in the experiment. In this paradigm, the requirement to earn an injection escalated according to the following series: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000 (Richardson and Roberts 1996; Martini and Valverde 2012). The breaking point is defined as the last ratio completed before self-administration behaviour is extinguished in a 2-h session. The PR session lasted for 2 h or until mice did not complete the ratio for delivery of one reinforcement within 1 h. The breaking point of the self-administration behaviour was determined in each animal, and the total quantity of cocaine in milligrams (mg) self-administered per animal in the 10 days of acquisition was also calculated.

**Statistical analyses**

All analyses were conducted using the statistical package Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). A mixed analysis of variance (ANOVA) was performed for motor activity measures before cocaine administration. Another was performed for motor response to cocaine administration with one within variable—doses, with five levels (0, 1, 5, 10 and 20 mg/kg of cocaine)—and two between variables—sex, with two levels (males and females), and pre-exposure, with two levels (saline and ethanol).

For CPP, the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning was analysed by means of

a mixed analysis of variance (ANOVA) with two between variables—sex, with two levels (male and female), and pre-exposure, with two levels (saline and ethanol)—and a within variable—days, with two levels (Pre-C and Post-C).

Other ANOVA was used to analyse differences between the number of infusion in the cocaine self-administration, with two between variables—sex, with two levels (male and female), and pre-exposure, with two levels (saline and ethanol)—and a within variable—days, with ten levels, followed by one-way ANOVA for comparisons between holes. The mean of total cocaine intake (mg) per group, the mean day of acquisition of the criteria and the responses obtained in the PR schedule were compared between conditions by one-way ANOVA.

Post hoc comparisons were performed with a Bonferroni test, and the data of some of the ANOVAs were also submitted to a Tukey's HSD post hoc test, as this test does not require a significant interaction between factors and is highly conservative against type I error (Wilcox 1987).

Additionally, Pearson's correlations were performed between the measures of CPP (conditioned score and time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test) and self-administration paradigms (number of infusions, intake in mg and PR).

## Results

### Experiment 1: long-term effects of an ethanol binge on locomotor activity responses induced by cocaine

The ANOVA for the locomotor activity before the administration of drug revealed a significant decrease in activity from the first (1–10 min) to the last periods (51–60 min) in all the experimental groups [ $F(1,58)=513.137$ ;  $p<0.0001$ ] (data not shown).

The results of the locomotor activity induced by different doses of cocaine are presented in Fig. 1. The ANOVA for locomotor activity after administration of saline or different doses of cocaine revealed a significant effect of sex [ $F(1,52)=4.812$ ;  $p<0.033$ ], showing that females were more active than males. A significant effect of doses [ $F(4,49)=54.007$ ;  $p<0.0001$ ] and the interactions sex\*doses [ $F(4,49)=3.066$ ;  $p<0.025$ ] and sex\*pre-exposure\*doses [ $F(4,49)=2.502$ ;  $p<0.05$ ] were detected. Sex differences in mice pre-exposed to saline were only observed after administration of saline ( $p<0.001$ ); however, sex differences in mice pre-exposed to EtOH were observed after administration of saline ( $p<0.001$ ) and cocaine dose of 1 mg/kg ( $p<0.012$ ), 10 mg/kg ( $p<0.045$ ) and 20 mg/kg ( $p<0.05$ ). Cocaine (1 mg/kg) induced higher activity in females pre-exposed to EtOH during adolescence than in those pre-treated with saline ( $p<0.01$ ). However, 20 mg/kg cocaine produced less activity in males pre-

exposed to EtOH during adolescence than in those pre-treated with saline ( $p<0.05$ ).

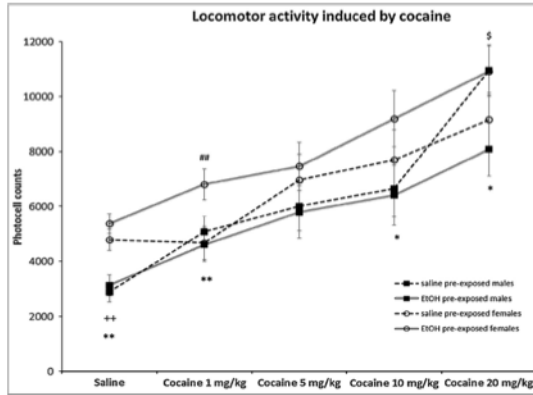
### Experiment 2: long-term effects of an EtOH binge on the CPP paradigm and on intravenous self-administration of cocaine

The results of the cocaine-induced CPP are presented in Fig. 2. The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning revealed a significant effect of the variable days [ $F(1,45)=38.651$ ;  $p<0.0001$ ] and the interaction days\*pre-exposure [ $F(3,45)=3.878$ ;  $p<0.015$ ]. Only males and females pre-exposed to EtOH during adolescence showed CPP ( $p<0.01$ ), while animals pre-exposed to saline (male and female) did not.

The results of the number of infusions are presented in Fig. 3a. The ANOVA performed for the data obtained with intravenous self-administration of cocaine revealed a significant effect of pre-exposure [ $F(1,19)=5.908$ ;  $p<0.025$ ], indicating a higher number of infusions in mice pre-exposed to EtOH during adolescence than those pre-exposed to saline. A significant effect of days [ $F(9,11)=3.092$ ;  $p<0.041$ ] and the interactions days\*pre-exposure [ $F(9,11)=2.916$ ;  $p<0.049$ ], sex\*days [ $F(9,11)=2.927$ ;  $p<0.048$ ] and sex\*days\*pre-exposure [ $F(9,11)=3.089$ ;  $p<0.041$ ] was also observed. A Bonferroni test showed that the females treated with EtOH performed a higher number of infusions than those treated with saline on days 3, 6, 7 and 8 ( $p<0.05$ ), while significant differences between males treated with EtOH or saline were only observed on day 10 ( $p<0.01$ ) (see Fig. 3a).

The ANOVA for total cocaine intake by each group revealed a significant effect of sex [ $F(1,23)=4.515$ ;  $p<0.045$ ], with females taking more cocaine than males, and a significant effect of pre-exposure [ $F(1,23)=6.155$ ;  $p<0.021$ ], with higher intake of cocaine among mice pre-treated with EtOH than those pre-treated with saline. As Tukey's post hoc tests showed, these effects were observed in the females pre-exposed to EtOH, which self-administered more cocaine than females pre-exposed to saline [ $F(3,26)=4.827$ ;  $p<0.01$ ; HSD Tukey:  $p<0.033$ ] (Fig. 3b). The ANOVA for the breaking point did not show differences among the groups [ $F(3,24)=0.838$ , n.s.] in the PR schedule. ANOVA for the day of acquisition revealed a significant effect of sex [ $F(1,24)=6.051$ ;  $p<0.021$ ] revealing that females were faster than males in the acquisition of rewarding response. Additionally, EtOH and saline pre-treated females discriminated between the active and the inactive holes from the third session on ( $p<0.05$ ) (see Fig. 4a), whereas male mice pre-treated with EtOH discriminated from the fourth session on and the males pre-treated with saline reached significant differences in days 4, 6, 8 and 10 (see Fig. 4b). In fact, the ANOVA for the number of active hole responses showed a significant effect of the interaction sex\*days\*pre-exposure [ $F(9,11)=2.855$ ;

**Fig. 1** Long-term effects of an ethanol (EtOH) binge during adolescence on the locomotor activity response induced by administration of different doses of cocaine (0, 1, 5, 10 and 20 mg/kg). The data represent the mean ( $\pm$ SEM) from 1 h after administration  $++p<0.01$  males pre-exposed to saline vs. females pre-exposed to saline;  $*p<0.05$  and  $**p<0.01$  males pre-exposed to EtOH vs. females pre-exposed to EtOH;  $##p<0.01$  females pre-exposed to saline vs. females pre-exposed to EtOH;  $Sp<0.05$  males pre-exposed to saline vs. males pre-exposed to EtOH



$p<0.05$ ], revealing a higher number of responses in females pre-exposed to EtOH than in males pre-exposed to EtOH and in control females on days 3, 6, 7 and 8 ( $ps<0.05$ ).

No significant Pearson's correlations between the measures of CPP and self-administration paradigms were detected. However, a positive correlation was observed between the number of infusions and PR ( $r=0.436$ ;  $p<0.026$ ) and between cocaine mg and PR ( $r=0.437$ ;  $p<0.026$ ).

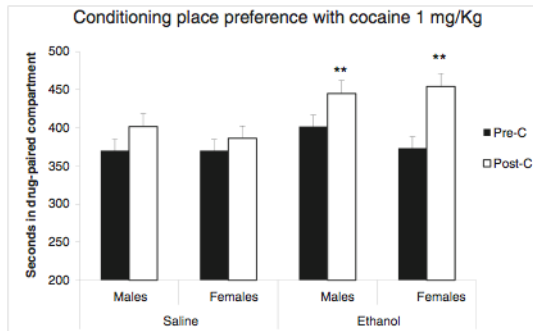
**Discussion**

The objective of this study was to assess the consequences that intermittent exposure to ethanol during adolescence can have on the locomotor and rewarding effects of cocaine in male and female adult mice. To our knowledge, this is the first study to

evaluate the long-term consequences of an EtOH binge during adolescence on the effects of cocaine in adult life in both sexes. Our results show that pre-exposure to EtOH during adolescence increases sensitivity to cocaine in the CPP and enhances cocaine self-administration in adult mice and that this latter effect varies between the sexes. Additionally, the motor response to cocaine was modulated by EtOH exposure according to the sex of the animal.

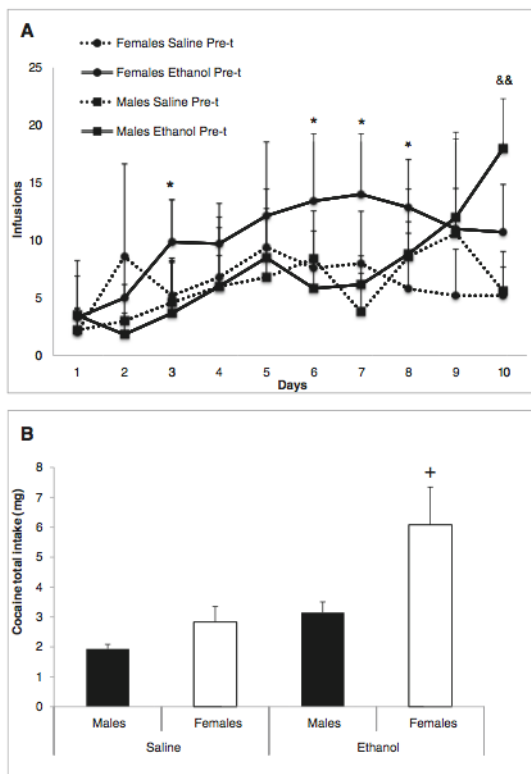
The main contribution of the present study is the demonstration that an EtOH binge during adolescence induces long-lasting effects in female mice in a different way to that seen in males. Although both EtOH pre-treated males and females developed preference in the CPP with a sub-threshold dose of cocaine while those pre-treated with the vehicle did not, females pre-exposed to EtOH with respect to controls presented a higher intake of cocaine and a more stable pattern of

**Fig. 2** Long-term effects of an ethanol binge during adolescence on the CPP induced by 1 mg/kg cocaine. Mice were repeatedly and intermittently treated during adolescence with physiological saline or 5 g/kg/day of ethanol. Three weeks after the end of adolescent pre-treatment, mice were conditioned with 1 mg/kg of cocaine. Bars represent mean ( $\pm$ SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (black) and after conditioning session (white).  $**p<0.01$  Pre-C vs. Post-C





**Fig. 3** Long-term effects of ethanol binge during adolescence on the reinforcing properties of cocaine evaluated by the intravenous self-administration paradigm. Female and male mice were trained daily to nose poke in the active hole in order to obtain an injection of cocaine (1 mg/kg/infusion) paired with a cue light located above the active hole. **a** Data represent the average number of infusions±SEM (nose pokes in the active hole followed by a reinforcer) during 1 h, daily. \* $p < 0.05$  females pre-exposed to EtOH vs. females pre-exposed to saline; and && $p < 0.01$  males pre-exposed to EtOH vs. males pre-exposed to saline. **b** Data represent the mean intake of cocaine in milligrams during the 10 days of acquisition. + $p < 0.05$  vs. females pre-exposed to saline



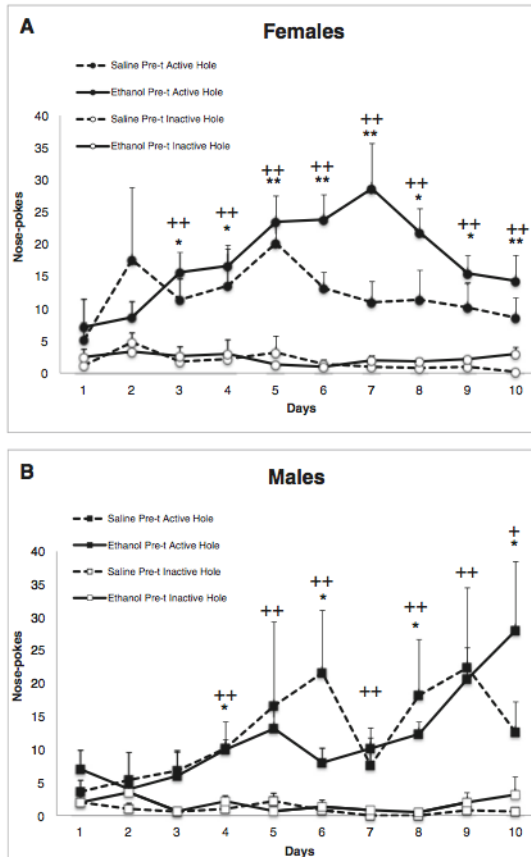
responses in intravenous self-administration paradigm than males. EtOH pre-treated females self-administered more cocaine than the other groups; they performed a significantly higher number of infusions than control females from the third day onwards, whereas the EtOH pre-treated males carried out a significantly higher number of infusions than their controls only on the last day (day 10). Moreover, early exposure to EtOH increased the locomotor activity response to cocaine in females while reducing the response in males, principally with the highest and lowest doses of the drug. Therefore, these results demonstrate that an alcohol binge during adolescence affects females and males in different ways.

The mice pre-treated with EtOH during adolescence (PND 26–39) exhibited greater sensitivity to the rewarding properties of cocaine in adulthood, since only the group of pre-

treated animals developed preference in the CPP induced with a sub-threshold dose of cocaine (1 mg/kg). Previous studies by our group have demonstrated that mice considered to be more vulnerable to drug addiction in accordance with their high novelty-seeking profile are capable of acquiring a conditioned response with this low dose of cocaine (Vidal-Infer et al. 2012; Arenas et al. 2014; Mateos-García et al. 2015). According to recent studies with cocaine and other drugs of abuse, early exposure to EtOH increases sensitivity to the rewarding effects of the drug in adult life (Do Couto et al. 2011; Hutchison and Riley 2012; Molet et al. 2013; Montagud-Romero et al. 2014). Cocaine 5 mg/kg induced significant CPP only in adult male mice that had been pre-exposed to EtOH for 5 days during adolescence (two daily administrations of 2.5 g/kg at PND 28–32) (Molet et al. 2013). In the same way, early



**Fig. 4** Responding on the active (filled squares for males and filled circles for females) and inactive (empty squares for males and empty circles for females) holes during acquisition of cocaine (1 mg/kg/infusion) self-administration in female (a) and male (b) mice. Data represent the mean of nose poke responses  $\pm$  SEM during 1 h, daily. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  active hole pre-exposed to saline vs. inactive hole pre-exposed to saline. + $p < 0.05$  and ++ $p < 0.01$  active hole pre-exposed to EtOH vs. inactive hole pre-exposed to EtOH



exposure to ethanol (2 g/kg/day for 10 days, PND 30–39) was shown to sensitize the conditioned rewarding effects of cocaine on CPP in adult male rats (Hutchison and Riley 2012). In another study, only adult male mice pre-exposed during adolescence to the same binge pattern as that used in the present work acquired CPP with 1 mg/kg of cocaine (Montagud-Romero et al. 2014). In the present study, besides a greater sensitivity to the rewarding properties of cocaine in CPP, the animals pre-treated with EtOH during adolescence presented a higher intake of drug in the intravenous cocaine self-administration paradigm. In

adulthood, mice pre-exposed to EtOH performed higher number of infusions and, therefore, a higher intake of cocaine than control animals. CPP and self-administration are the most widely used paradigms for evaluating the rewarding effects of cocaine (Tzschentke 1998, 2007; Aguilar et al. 2009). Hence, we felt it that would be of great interest to assess if an experimental procedure such as ethanol exposure during adolescence, which increases the conditioning rewarding effects of cocaine, also increases cocaine intake in the self-administration paradigm. For the same animals to undergo

the two paradigms implies some limitations with respect to the interpretation of results, but it also provides us the opportunity to compare the motivational effects of drugs in both animal models. Since the same set of mice was tested in both the CPP and self-administration paradigms, one might assume that cocaine administration during CPP acquisition (1 mg/kg/day during 4 days) sensitized subsequent self-administration. All animals—whether pre-exposed during adolescence to saline or ethanol—received the same number of cocaine injections in the CPP; nevertheless, those pre-exposed to ethanol showed a significantly higher intake of cocaine self-administration than those pre-exposed to saline. It is also possible that pre-exposure to alcohol during adolescence had an impact on the degree to which mice became sensitized to the cocaine received during CPP, and it may have had a differential effect on self-administration of the drug by which it increased cocaine intake. Another possible explanation for these results is that exposure to ethanol during adolescence might have attenuated the aversive effects of cocaine in adult mice, leading to an increase in self-administration of the drug. It has been proved that adolescent exposure to ethanol attenuates the aversive effects of cocaine in adult mice (Hutchison et al. 2010), and recent works have shown that drug intake depends on the balance between rewarding and aversive effects, with animals that are less sensitive to the aversive effects of the drug (i.e. those that develop less taste aversion) exhibiting higher levels of drug self-administration (Riley 2011; Verendeov and Riley 2012, 2013). Together, these results highlight the important role that early exposure to alcohol can play in the development of cocaine abuse in adulthood.

On the other hand, although the group exposed to EtOH during adolescence showed both greater sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine on CPP and higher cocaine self-administration than that exposed to saline, no significant statistical correlation was detected between the measures of CPP (conditioned score and time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test) and self-administration (number of infusions and intake in milligram). These data lead us to conclude that the two paradigms employed herein evaluate independent aspects of the rewarding effects of drugs, as indicated in the literature (Tzschentke 1998, 2007; Aguilar et al. 2009). The CPP and self-administration paradigms assess different aspects of reward and, thus, different characteristics of addictive behaviour. Self-administration involves operant conditioning, models' drug-taking behaviour and evaluates the primary rewarding properties of drugs, while CPP involves Pavlovian conditioning, models' cue-elicited drug-taking behaviour and assesses the incentive value of drug-associated cues for maintaining addictive behaviour.

However, the lack of differences in the PR schedule of response to cocaine seem to suggest that exposure to EtOH

during adolescence does not alter motivation by cocaine as reinforcer, in contrast to that shown in a previous study (Alaux-Cantin et al. 2013) which reported that intermittent EtOH intoxications during early adolescence enhanced motivation for EtOH in the self-administration paradigm. Nevertheless, we consider that the aforementioned lack of differences in our study could be due to the number of sessions evaluated: a mere 10 days in contrast to the 5 weeks assessed by Alaux-Cantin et al. (2013). Moreover, positive correlations observed between the number of infusions and PR and between cocaine mg and PR indicate that animals which carried out a higher number of infusions and intake of cocaine presented a greater PR. As our data clearly show a significantly higher intake of cocaine in mice pre-exposed to ethanol than in those pre-exposed to saline, a possible greater motivation for cocaine could be interpreted. On the other hand, in contrast to our results, intermittent EtOH intoxications during adolescence did not alter amphetamine-induced CPP in that study (Alaux-Cantin et al. 2013), possibly because the doses employed were also effective to induce CPP in rats that had not been pre-exposed to EtOH unlike the results of the present study, where we used a sub-threshold dose of cocaine, which was ineffective to induce CPP in mice that had not been pre-exposed to EtOH. The observed changes in the rewarding effects of cocaine in mice pre-exposed to EtOH in the previous and present studies could be related to the impact of adolescent EtOH on the dopaminergic neurotransmission system (D1 and D2 receptors and their transduction pathways), which undergo critical maturation during adolescence (Tarazi and Baldessarini 2000). In fact, elevated dopamine levels have been reported in the nucleus accumbens at baseline in rats exposed to EtOH during adolescence (Badanich et al. 2007; Pascual et al. 2009; Philpot et al. 2009). Furthermore, our results also confirmed that females acquired criteria for the self-administration of cocaine faster than males, according to other studies in rats (Carroll et al. 2002; Lynch and Carroll 1999) and mice (Martini et al. 2014).

In the present study, pre-exposure to EtOH during adolescence altered motor reactivity to cocaine in a sex-dependent manner in adult mice. We have observed a slight long-term effect of early pre-exposure to EtOH on motor response, which varied depending on sex. Only in females was there a tendency for EtOH pre-exposure to increase the motor response to cocaine, with this effect proving to be significant with the low dose. Conversely, males pre-exposed to EtOH showed a reduced response to cocaine with the high dose. Moreover, among the mice pre-exposed to EtOH, females presented a stronger motor response to most doses of cocaine than males. In accordance with our results, male rats pre-treated with EtOH in adolescence have been reported to exhibit a decrease in gross locomotor activity (consecutive beam breaks) in response to cocaine in adulthood (Hutchison et al. 2010); however, to our knowledge, there are no available data

on the long-term effects of early EtOH exposure on the subsequent motor response to cocaine in females. On the other hand, our results confirm that females display more locomotor activity than males, which is in line with previous studies (Dalla and Shors 2009; Navarro-Francés and Arenas 2014). Moreover, they verify that early EtOH pre-exposure does not alter motor habituation to a novel environment, since mice in all the experimental groups significantly decreased their spontaneous activity during the 60-min habituation period prior to drug administration.

Despite limited research to date, evidence of the long-lasting effects of adolescent EtOH exposure has already emerged, which is relevant, since this developmental period is the time when alcohol use is typically initiated (Spear and Swartzwelder 2014). It has been described that binge-like EtOH exposure during adolescence alters adult brain reward function in response to acute EtOH administration, increasing intake and enhancing motivation for EtOH in the self-administration paradigm and reducing both the aversive and rewarding properties of EtOH (Alaux-Cantin et al. 2013; Boutros et al. 2014). Although it has been reported that progression to illicit drug use among humans is associated with prior use of alcohol, few studies have explored the consequences of exposure to EtOH during adolescence on the rewarding effects of other drugs, including cocaine, and to an even lesser extent have they focused on the female sex (Kandel et al. 1992; Crews et al. 2007). It is known that women are more sensitive to the effects of psychostimulants and progress from initial use to drug addiction more rapidly than men (Anker and Carroll 2011; Becker and Hu 2008). The present results confirm this, and they also reveal that exposure to EtOH during a developmental period such as adolescence can enhance this tendency. Future studies should also assess early exposure of both male and female mice to EtOH using a dose–response approach to cocaine administration in the CPP and self-administration paradigms; this way, alterations in sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine observed recently in adult male rats (Hutchison and Riley 2012) may be confirmed. Furthermore, it would be of interest for future studies to determine if pre-exposure to EtOH during adulthood also induces increased vulnerability to cocaine. In conclusion, our data confirm that adolescent exposure to alcohol has long-term consequences and alters the multiple effects of cocaine, including its motor and rewarding properties. Particularly, our study reveals, for the first time, that intermittent exposure to ethanol during adolescence increases, in a sex-dependent manner, sensitivity to cocaine and its intake in adulthood.

**Acknowledgments** We wish to thank to PhD Ana Díaz, responsible for the welfare of experimental animals in our university, for her assistance with the animal surgery and Brian Normanly for his editing of the manuscript. This work was supported by the following research grants:

Ministerio de Economía y Competitividad, Dirección General de Investigación, PSI2011-24762, Instituto de Salud Carlos III, Red de Trastornos Adictivos (RTA) RD12/0028/0005 and RD12/0028/0024 Fondos FEDER

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas, Proyectos de Investigación sobre Drogodependencias, 2014I007. Generalitat Valenciana, Conselleria de Educación, PROMETEOII/2014/063. The European Foundation for Alcohol Research (ERAB), EA13 08.



References

Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2009) Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev* 59:253–77. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.08.002

Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R, Botia B, Pierrefiche O, Vilpoux C, Naassila M (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 67:521–31. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.12.007

Alfonso-Loeches S, Gueri C (2011) Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:19–47. doi:10.3109/10408363.2011.580567

Anker JJ, Carroll ME (2011) Females are more vulnerable to drug abuse than males: evidence from preclinical studies and the role of ovarian hormones. *Curr Top Behav Neurosci* 8:73–96. doi:10.1007/7854\_2010\_93

Arenas MC, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2014) Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Physiol Behav* 22(133):152–60. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.028

Arias F, Szman N, Vega P, Mesias B, Basurte I, Morant C, Ochoa E, Poyo F, Babin F (2013) Cocaine abuse or dependency and other psychiatric disorders. Madrid study on dual pathology. *Rev Psiquiatr Salud Ment* 6:121–8. doi:10.1016/j.rpsm.2012.09.002

Badanich KA, Maldonado AM, Kirstein CL (2007) Chronic ethanol exposure during adolescence increases basal dopamine in the nucleus accumbens septi during adulthood. *Alcohol Clin Exp Res* 31:895–900

Becker JB, Hu M (2008) Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 29:36–47

Boutros N, Semenova S, Markou A (2014) Adolescent intermittent ethanol exposure diminishes anhedonia during ethanol withdrawal in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* 24:856–64. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.01.022

Cable N, Sacker A (2008) Typologies of alcohol consumption in adolescence: predictors and adult outcomes. *Alcohol Alcohol* 43:81–90

Carroll ME, Morgan AD, Lynch WJ, Campbell UC, Dess NK (2002) Intravenous cocaine and heroin self-administration in rats selectively bred for differential saccharin intake: phenotype and sex differences. *Psychopharmacology (Berl)* 161:304–313



- Centers for Disease Control (2013) Youth Risk Behavior Surveillance System (YRBSS). Available at: <http://www.cdc.gov/healthyyouth/yrbss/index.htm>
- Crews F, He J, Hodge C (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):189–99
- Dalla C, Shors TJ (2009) Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiol Behav* 97:229–38. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.035
- Degenhardt L, O'Loughlin C, Swift W, Romaniuk H, Carlin J, Coffey C, Hall W, Patton G (2013) The persistence of adolescent binge drinking into adulthood: findings from a 15-year prospective cohort study. *BMJ Open* 3, e003015. doi:10.1136/bmjopen-2013-003015
- Do Couto BR, Rodríguez-Arias M, Fuentes S, Gagliano H, Armario A, Miñarro J, Aguilar MA (2011) Adolescent pre-exposure to ethanol or MDMA prolongs the conditioned rewarding effects of MDMA. *Physiol Behav* 103:585–93. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.012
- Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP (2003) Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75:411–8
- ESTUDES (2013) Informe de la encuesta estatal sobre el uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias. Delegación del gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas website. Ministerio de Sanidad y Política Social, Gobierno de España, Available: [http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/PresentESTUDES2012\\_2013.pdf](http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/PresentESTUDES2012_2013.pdf)
- Grant BF, Stinson FS, Harford TC (2001) Age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol abuse and dependence: a 12-year follow-up. *J Subst Abuse* 13:493–504
- Guerri C (2002) Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotox Res* 4: 327–35
- Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 5:73–8
- Hibell B, Guttormsson U, Ahlström S, et al (2012) The 2011 ESPAD Report: Substance use among students in 36 European Countries. Stockholm: The Swedish Council for Information on Alcohol and other Drugs (CAN) The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Council of Europe, Co-operation Group to Combat Drug Abuse and Illicit Trafficking in Drugs (Pompidou Group). Available: [http://www.espad.org/Uploads/ESPAD\\_reports/2011/The\\_2011\\_ESPAD\\_Report\\_FULL\\_2012\\_10\\_29.pdf](http://www.espad.org/Uploads/ESPAD_reports/2011/The_2011_ESPAD_Report_FULL_2012_10_29.pdf)
- Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006) Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 160:739–46
- Hutchison MA, Albaugh DL, Riley AL (2010) Exposure to alcohol during adolescence alters the aversive and locomotor-activating effects of cocaine in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 97:370–6. doi:10.1016/j.pbb.2010.09.006
- Hutchison MA, Riley AL (2012) Ethanol exposure during either adolescence or adulthood alters the rewarding effects of cocaine in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 101:458–64. doi:10.1016/j.pbb.2012.02.007
- Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG, Schulenberg JE (2013) Monitoring the Future: National survey results on drug use, 1975–2012; 2012 Overview; Key Findings on Adolescent Drug Use. (Ann Arbor: Institute for Social Research, The University of Michigan). Available: <http://www.monitoringthefuture.org/pubs/monographs/mtf-overview2013.pdf>
- Kandel DB, Yamaguchi K, Chen K (1992) Stages of progression in drug involvement from adolescence to adulthood: further evidence for the gateway theory. *J Stud Alcohol* 53:447–57
- Koss WA, Sadowski RN, Sherrill LK, Gulley JM, Juraska JM (2012) Effects of ethanol during adolescence on the number of neurons and glia in the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala of adult male and female rats. *Brain Res* 1466:24–32. doi:10.1016/j.brainres.2012.05.023
- Lynch WJ, Carroll ME (1999) Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 144:77–82
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001) Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 121:189–97
- Martini M, Pinto AX, Valverde O (2014) Estrous cycle and sex affect cocaine-induced behavioural changes in CD1 mice. *Psychopharmacology* 231:2647–59. doi:10.1007/s00213-014-3433-5
- Martini M, Valverde O (2012) A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology* 219:149–158. doi:10.1007/s00213-011-2385-2
- Mateos-García A, Roger-Sánchez C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Manzanedo C, Arenas MC (2015) Higher sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine and MDMA in High-Novelty-Seekers mice exposed to a cocaine binge during adolescence. *Psychopharmacology* 232(1):101–13. doi:10.1007/s00213-014-3642-y
- McClain JA, Morris SA, Marshall SA, Nixon K (2014) Ectopic hippocampal neurogenesis in adolescent male rats following alcohol dependence. *Addict Biol* 19:687–99. doi:10.1111/adb.12075
- Molet J, Bouaziz E, Harmon M, Lanfumey L (2012) Early exposure to ethanol differentially affects ethanol preference at adult age in two inbred mouse strains. *Neuropharmacology* 63:338–48. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.03.028
- Molet J, Hervé D, Thiébot MH, Harmon M, Lanfumey L (2013) Juvenile ethanol exposure increases rewarding properties of cocaine and morphine in adult DBA/2 J mice. *Eur Neuropharmacol* 23:1816–25. doi:10.1016/j.euroeuro.2013.03.010
- Montagud-Romero S, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2014) The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of intermittent ethanol administration during adolescence. *PLoS One* 9, e92576. doi:10.1371/journal.pone.0092576
- Navarro-Francés CI, Arenas MC (2014) Influence of trait anxiety on the effects of acute stress on learning and retention of the passive avoidance task in male and female mice. *Behav Process* 105:6–14. doi:10.1016/j.beproc.2014.02.009
- Newsletter NIAAA (2004) National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism. Department of health and human Services-National Institutes of Health website. Office of Research Translation and Communications, Bethesda, Maryland, Available: [http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter\\_Number3.pdf](http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf)
- Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Miñarro J, Guerri C (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci* 25:541–50
- Pascual M, Boix J, Felipe V, Guerri C (2009) Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neurochem* 108:920–31. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05835.x
- Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loesches S, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Guerri C (2012) Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* 62: 2309–19. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.01.011
- Philpot RM, Wecker L, Kirstein CL (2009) Repeated ethanol exposure during adolescence alters the developmental trajectory of dopaminergic output from the nucleus accumbens septi.

- Int J Dev Neurosci 27:805–15. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.009
- Quoilin C, Didone V, Tirelli E, Quertemont E (2014) Higher long-lasting ethanol sensitization after adolescent ethanol exposure in mice. *Psychopharmacology* 231:1821–9. doi:10.1007/s00213-013-3376-2
- Richardson NR, Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66:1–11
- Riley AL (2011) The paradox of drug taking: the role of the aversive effects of drugs. *Physiol Behav* 103:69–78. doi:10.1016/j.physbeh.2010.11.021
- Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Vidal-Infer A, Guerni C, Aguilar MA, Miñarro J (2011) Intermittent ethanol exposure increases long-lasting behavioural and neurochemical effects of MDMA in adolescent mice. *Psychopharmacology* 218:429–442. doi:10.1007/s00213-011-2329-x
- Roger-Sanchez C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Aragon CM, Miñarro J (2012) Age- and sex-related differences in the acquisition and reinstatement of ethanol CPP in mice. *Neurotoxicol Teratol* 34:108–15. doi:10.1016/j.nt.2011.07.011
- Sherrill LK, Berthold C, Koss WA, Juraska JM, Gulley JM (2011a) Sex differences in the effects of ethanol pre-exposure during adolescence on ethanol-induced conditioned taste aversion in adult rats. *Behav Brain Res* 225:104–9. doi:10.1016/j.bbr.2011.07.003
- Sherrill LK, Koss WA, Foreman ES, Gullley JM (2011b) The effects of pre-pubertal gonadectomy and binge-like ethanol exposure during adolescence on ethanol drinking in adult male and female rats. *Behav Brain Res* 216:569–75. doi:10.1016/j.bbr.2010.08.048
- Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30:1670–1680
- Spear LP, Swartzwelder HS (2014) Adolescent alcohol exposure and persistence of adolescent-typical phenotypes into adulthood: a mini-review. *Neurosci Biobehav Rev* 45C:1–8. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.04.012
- Spear LP, Varlinskaya EI (2005) Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. *Recent Dev Alcohol* 17:143–59
- Tarazi FI, Baldessarini RJ (2000) Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int J Dev Neurosci* 18:29–37
- Tzschentke TM (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56:613–72. doi:10.1016/S0304-0082(98)00060-4
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12:227–462. doi:10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x
- Varlinskaya EI, Spear LP (2002) Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1502–11
- Varlinskaya EI, Truxell E, Spear LP (2014) Chronic intermittent ethanol exposure during adolescence: effects on social behavior and ethanol sensitivity in adulthood. *Alcohol* 48:433–44. doi:10.1016/j.alcohol.2014.01.012
- Verendeev A, Riley AL (2012) Conditioned taste aversion and drugs of abuse: history and interpretation. *Neurosci Biobehav Rev* 36(10):2193–205. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.08.004
- Verendeev A, Riley AL (2013) The role of the aversive effects of drugs in self-administration: assessing the balance of reward and aversion in drug-taking behavior. *Behav Pharmacol* 24:363–74. doi:10.1097/FBP.0b013e32836413d5
- Vidal-Infer A, Arenas MC, Daza-Losada M, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2012) High novelty-seeking predicts greater sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 102:124–32. doi:10.1016/j.pbb.2012.03.031
- Wilcox RR (1987) New designs in analysis of variance. *Annu Rev Psychol* 38:29–60
- Wittchen HU, Behrendt S, Höfler M, Perkonig A, Lieb R, Bühringer G, Beesdo K (2008) What are the high risk periods for incident substance use and transitions to abuse and dependence? Implications for early intervention and prevention. *Int J Methods Psychiatr Res* 17: S16–29. doi:10.1002/mpr.254
- Zeelenberg R, Pecher D (2015) A method for simultaneously counterbalancing condition order and assignment of stimulus materials to conditions. *Behav Res Methods* 47(1):127–33. doi:10.3758/s13428-014-0476-9



**7.3. Estudio 3: El topiramato incrementa el refuerzo condicionado inducido con cocaína en ratones adultos jóvenes, limitando así su utilidad clínica.**

Este estudio está publicado en la revista *Psychopharmacology* (Berl). 2016 Sep 5. [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s00213-016-4409-4.

**7.3.1. Introducción**

La adicción a la cocaína es una enfermedad crónica y recidivante del uso compulsivo de drogas asociado a múltiples complicaciones médicas y psicosociales, por lo que representa un importante problema de salud pública (Karila y cols., 2008; UNODC, 2014). Además, es importante decir que actualmente no existe un tratamiento farmacológico específico eficaz para la dependencia a la cocaína, sus síntomas de abstinencia o prevención de recaídas (EMCDDA, 2007; Kim y Lawrence, 2014). Por todo ello, existe una necesidad de evaluar nuevas herramientas farmacológicas para el tratamiento de la dependencia a la cocaína (Gass y Olive, 2008; Kim y Lawrence, 2014).

### **Estudio 3**

El topiramato es un fármaco anticonvulsivo que está siendo evaluado para el tratamiento de la adicción a la cocaína (Karila y cols., 2008; Gass y Olive, 2008; Lin, 2013; Johnson y cols., 2013a; Kim y Lawrence, 2014; Minozzi y cols., 2015). Sus principales acciones neurofarmacológicas, como son la facilitación de la neurotransmisión GABAérgica y el bloqueo de los receptores del glutamato AMPA/kainato, se han relacionado con su potencial como neuroestabilizador y reducción de la actividad dopaminérgica mesolímbica, por lo que podrían apoyar su utilidad atenuando las propiedades reforzantes de las drogas de abuso (Johnson, 2004; 2005; Reis y cols., 2008; Johnson y cols., 2013a; Johnson y cols., 2013b). Se ha asociado el tratamiento con topiramato con una mejora clínicamente significativa en la gravedad de la dependencia de la cocaína en seres humanos, siendo más eficaz que el placebo aumentando la probabilidad de abstinencia a la droga (Kampman y cols., 2004, Johnson y cols., 2013a), disminuyendo el *craving* en dependientes a la cocaína (Reis y cols., 2008, Johnson y cols., 2013a y 2013b), así como las recaídas en el consumo (Kampman y cols., 2004). Sin embargo, otros estudios no han encontrado indicios claros de eficacia del tratamiento con topiramato sobre el tratamiento de los pacientes dependientes de cocaína (crack) (Nuijten y cols., 2014), sobre el mantenimiento de la abstinencia (Reis y cols., 2008; Umbricht y cols., 2014), así como en la reducción del *craving* y el consumo de la droga (Kampman y cols., 2013; Umbricht y cols., 2014). Es importante destacar que la eficacia del topiramato parece estar



relacionada al hecho de combinarlo con una práctica regular de terapia cognitivo-conductual (Kim y Lawrence, 2014). De este modo, los resultados entre los estudios pre-clínicos y clínicos son controvertidos ofreciendo resultados muy variables, por lo que se cuestiona su eficiencia como tratamiento eficaz (Minozzi y cols., 2015).

Pocos estudios preclínicos han evaluado los efectos del topiramato sobre las propiedades reforzantes de la cocaína en modelos animales y, además, sus resultados son poco esclarecedores. Aunque el topiramato redujo la auto-administración de cocaína (Jonhson, 2005; Karila y cols., 2008), e inhibió el aumento de la auto-administración de etanol inducido por la cocaína (Echeverry-Alzate y cols., 2014), la administración de una sola dosis de topiramato no bloqueó el aumento de la actividad motora inducida por la cocaína (Echeverry-Alzate y cols., 2014.), ni mostró una disminución en la discriminación de los efectos de la cocaína (Le Foll y cols., 2008). Por todo ello, se necesitan de más estudios para poder comprender la posible utilidad terapéutica del topiramato para el tratamiento de la dependencia a la cocaína.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de este fármaco para bloquear los efectos reforzantes de la cocaína en ratones adultos jóvenes. Para ello, se empleó el paradigma de CPL, ya que este

### ***Estudio 3***

paradigma se ha utilizado ampliamente para investigar los efectos motivacionales de drogas de abuso (Tzschentke, 2007), y también se han utilizado para evaluar las fases de extinción y reinstauración de la recaída (Aguilar y cols., 2009) en modelos animales. Por todo ello, se evaluó el efecto de la administración de topiramato sobre las fases de adquisición, expresión y extinción del modelo de CPL en ratones. Además, se realizó el análisis de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real para analizar los mecanismos neurobiológicos que produce el topiramato sobre el poder reforzante de la cocaína. En animales tratados con TPM o vehículo durante las sesiones de condicionamiento, se analizaron cambios sobre el área tegmental ventral (ATV) en la expresión génica de la tirosina hidroxilasa (TH) y el transportador de la DA (DAT), ambos implicados en el refuerzo inducido por la cocaína (Balda y cols., 2009; Belin y cols., 2007; Darland y cols., 2012)

#### **7.3.2. Material y métodos**

##### **7.3.2.1. Sujetos experimentales**

Se emplearon un total de 164 ratones machos de la cepa OF1 (Charles River, Barcelona, España). Los animales llegaron al laboratorio en el

PND 42, y fueron alojados en grupos de cuatro en jaulas de plástico (28 cm largo x 28 cm de ancho x 14.5 cm de altura) en las siguientes condiciones: temperatura constante ( $21 \pm 2^\circ \text{C}$ ), una humedad relativa del 60%, un ciclo de luz 12h no invertido (luces encendidas entre 08:00-20:00), y alimentos y agua disponible *ad libitum* (excepto durante las pruebas de conducta). Los procedimientos realizados a los ratones, así como su cuidado, se llevaron a cabo en acuerdo a las leyes y regulaciones nacionales, regionales y locales, que están en conformidad con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 en la protección de los animales utilizados con fines científicos. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia.

### **7.3.2.2. Tratamiento farmacológico**

El topiramato (Topamax<sup>®</sup> por Janssen-Cilag, Madrid, España) fue disuelto en agua destilada, y preparado diariamente. En todos los experimentos, el topiramato se administró p.o. en un volumen de 0.005 ml/g. El clorhidrato de cocaína (Laboratorios Alcaliber SA Madrid, España) se diluyó en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) y fue administrado i.p. en un volumen de 0.01 ml/g. Como vehículo se empleó solución salina y agua destilada.

### **Estudio 3**

#### **7.3.2.3. Aparatos**

Para el CPL, se emplearon ocho cajas de plexiglás, con dos compartimentos de igual tamaño (30,7 cm largo x 31.5 cm de ancho x 34.5 cm de altura) separados por una zona central gris (13,8 cm largo x 31.5 cm de ancho x 34.5 cm de altura). Los compartimentos tienen diferente color en las paredes (negro vs. blanco) y diferentes texturas de suelo (liso en el compartimento negro y rugoso en el blanco). Las cajas poseen cuatro haces de luz infrarroja en cada compartimento y seis en la zona central para registrar la posición del animal, así como el número de cruces entre compartimentos de manera automática,. El equipo fue controlado por dos ordenadores IBM PC utilizando el software MONPRE 2Z (Cibertec SA, España).

#### **7.3.3. Procedimientos**

##### **7.3.3.1. Procedimiento de CPL**

*Adquisición.* Los animales fueron manipulados brevemente en cada uno de los 3 días previos a la iniciación del CPL, que consistió en tres fases que tuvieron lugar durante el ciclo de luz. En la primera fase, se

les permitió el acceso a los animales a ambos compartimientos del aparato durante 15 minutos (900 segundos) por día, en 3 días consecutivos. El día 3, el tiempo invertido por un animal en cada compartimento durante un período de 900 segundos fue registrado. En cada grupo, la mitad de los animales recibieron el fármaco o vehículo en un compartimiento y la otra mitad en el otro compartimento. Después de asignar los compartimentos, un análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre el tiempo pasado en el compartimento asociado al vehículo durante la fase de pre-condicionamiento (Pre-C). En la segunda fase (condicionamiento), los animales se condicionaron con la cocaína a través de cuatro emparejamientos en el compartimento asociado. Los animales tratados con cocaína se sometieron a dos emparejamientos por día, recibiendo una inyección de cocaína (0, 1 o 25 mg/kg) e, inmediatamente después, se introdujeron al compartimento asociado a la droga durante 30 min. Más tarde, recibieron una inyección de solución salina, después de un intervalo de 4 horas, inmediatamente antes del confinamiento en el compartimento de asociado al vehículo durante 30 min. La zona central se hizo inaccesible durante el condicionamiento. Durante la tercera fase, o post-condicionamiento (Post-C), las puertas de guillotina se retiraron de los dos compartimentos y se registró el tiempo dedicado por los ratones no tratados en cada compartimento, durante un período de 900 segundos. La diferencia en segundos entre el tiempo pasado en el

### ***Estudio 3***

compartimento asociado con la droga en el Post-C y el tiempo en el mismo compartimento en el Pre-C se considera que es una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga. Si esta diferencia es positiva, entonces el fármaco ha inducido una preferencia hacia el compartimento asociado a la droga, mientras que lo contrario indica el desarrollo de una aversión. Las dosis seleccionadas para inducir CPL se basaron en estudios previos de nuestro laboratorio (Maldonado y cols., 2006; Manzanedo y cols., 2012).

*Extinción.* Después del Post-C, los ratones se sometieron dos veces a la semana a una sesión de extinción, que consistió en colocar los animales en el aparato (sin las puertas de guillotina que separan los compartimentos) por un período de 15 min hasta que el tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga por cada grupo de animales fue similar al registrado en la sesión de Pre-C. Por lo tanto, todos los animales de cada grupo recibieron el mismo número de sesiones de extinción, con independencia de sus puntuaciones individuales, ya que el criterio de extinción fue la falta de diferencias significativas con respecto a los valores pre-C del grupo completo. La extinción de CPL siempre fue confirmada en una sesión posterior realizada 24 horas después de la última sesión de extinción.

*Reinstauración.* Los efectos de una dosis *priming* de cocaína se evaluaron después de 24 horas de haber confirmado la extinción. La prueba de reinstauración fue la misma que la realizada en el Post-C (deambulaci3n libre durante 15 minutos), excepto que los animales hicieron el test 15 minutos despu3s de la administraci3n de una dosis de cocaína. Cuando se logr3 la reinstauraci3n de la preferencia, despu3s de un proceso de extinción posterior, se llev3 a cabo una nueva prueba de reinstauraci3n con dosis progresivamente m3s bajas (la mitad de la dosis utilizada en el *priming* anterior) de la droga.

### **7.3.3.2. PCR en tiempo real**

Se realiz3 el an3lisis de la expresi3n g3nica de la TH y el DAT de los ratones del experimento 1 expuestos en el condicionamiento a soluci3n salina (SAL) o cocaína (COC, 25 mg/kg) y tratados con veh3culo (VEH) o topiramato (TPM, 50 mg/kg). El ARN total se obtuvo de las secciones cortadas mediante la t3cnica del *micropunch* en el ATV y almacenadas a -80c. Para la extracci3n de ARN total se utiliz3 el reactivo Tri Reagent (Life Technologies) y posteriormente se llev3 a cabo la retrotranscripci3n al ADN complementario. El an3lisis cuantitativo de la expresi3n g3nica de la TH y DAT se midi3 usando Ensayos Taqman (Taqman Gene Expression Assay), BMm\_00447546m1^ para TH y BMm00438388\_m1^ para DAT (Life

### **Estudio 3**

Technologies). La medición se realizó con el Sistema Detector de Secuencia StepOne Plus (Life Technologies), y el gen de referencia utilizado fue Rn18S ARNr para asegurar la validez de los resultados. Las muestras del gen diana y de referencia se realizaron por duplicado. Los datos se normalizaron y ajustaron a cada muestra respecto al gen endógeno de referencia, utilizando la expresión matemática  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001), de tal manera que los niveles de las muestras experimentales se expresan en relación a los niveles de las muestras del grupo control.

#### **7.3.4. Diseño experimental**

Tras el período de aclimatación al laboratorio de 5 días, los animales comenzaron los procedimientos experimentales (ver Tabla 1 para una descripción más detallada). En el experimento 1 se evaluaron los efectos de la administración de TPM (50 mg/kg) sobre la adquisición de CPL inducido por cocaína (0, 1 and 25 mg/kg) en ratones, o sobre la expresión del CPL inducido con cocaína 25 mg/kg. Además, se analizó la expresión génica de la TH y la DAT en el ATV, mediante PCR en tiempo real. En el experimento 2 se evaluó el efecto de un tratamiento crónico de topiramato (50 mg/kg/12horas) administrado previamente sobre la adquisición del CPL inducido por cocaína (25 mg/kg). Finalmente, en el experimento 3 se evaluó la eficacia de un



tratamiento crónico de topiramato (50 mg/kg/12horas) administrado de manera posterior al CPL inducido por cocaína sobre el proceso de extinción (25 mg/kg). La dosis de topiramato empleado estuvo basada en estudios previos, ya que la administración de topiramato (50 mg/kg/12horas) (p.o.) es efectiva bloqueando los signos motores y reduciendo la conducta ansiosa en ratones con síndrome de abstinencia al cannabis (Aracil-Fernández y cols., 2013), y reduciendo la ansiedad e impulsividad de ratones *navie* en el test del refuerzo demorado (Navarrete y cols., 2012a y 2012b).

**7.3.4.1. Experimento 1: Efecto del topiramato (50 mg/kg) en la adquisición y expresión de CPL inducido por diferentes dosis de cocaína.**

Los animales (n=94) recibieron una dosis de vehículo o topiramato 50 mg/kg (po), y fueron devueltos a sus jaulas inmediatamente después. Posteriormente, 60 minutos más tarde después de cada administración, recibieron una inyección ip de cocaína (0, 1 o 25 mg/kg) y fueron confinados en el compartimento asociado a la droga. Este procedimiento se llevó a cabo durante 4 días de condicionamiento (PND 53, 54, 55 y 56). Se establecieron los siguientes grupos experimentales: Veh+Sal, n=8; Veh+C1, n=10;

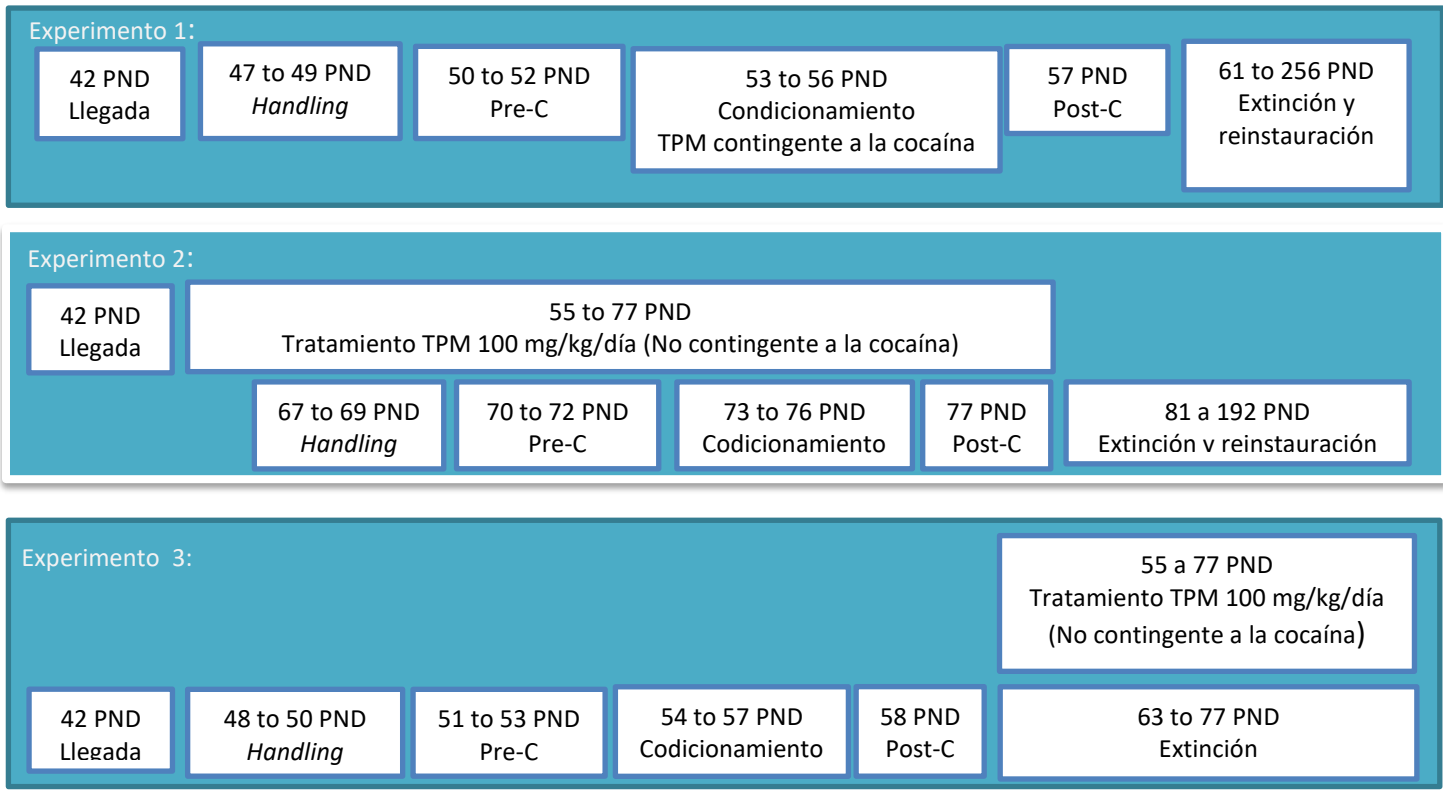


Tabla 1. Diseño experimental

Veh+C25, n=9; TPM50+Sal, n=11; TPM50+C1, n=12 y TPM50+C25, n=12. Otro set diferente de animales (n=19) recibieron 25 mg/kg ip de cocaína y fueron confinados al compartimento asociado a la droga durante 4 día. Después, el día del Post-C y 60 minutos antes del test, los animales recibieron una dosis de TPM 50 mg/kg (po) o vehículo. Se establecieron los siguientes grupos experimentales: Veh Post-C, n=9 y TPM Post-C, n=10.

La extracción de cerebros se realizó en un grupo adicional de animales (n=8 por grupo) que recibieron el mismo tratamiento y manipulación, y que correspondió al último día de condicionamiento. Los ratones fueron sacrificados 2 horas y 30 minutos después de la administración de vehículo o TPM 50 mg/kg, y 1 hora y 30 minutos después de la última inyección ip de cocaína 25 mg/kg. Los cerebros fueron extraídos del cráneo y congelados con hielo seco.

**7.3.4.2. Experimento 2: Efecto del tratamiento crónico con topiramato (50 mg/kg/12 h) en la adquisición de CPL inducido por cocaína (25 mg/kg).**

Los animales comenzaron un tratamiento crónico de topiramato 50 mg/kg/dosis o vehículo po en el PND 55 con una frecuencia de dos

### **Estudio 3**

administraciones diarias separadas por un intervalo de 12 horas y administradas en una habitación iluminada 7 días a la semana durante un periodo total de 23 días (15 días antes de comenzar el condicionamiento con cocaína 25 mg/kg y 8 días durante el condicionamiento, 46 dosis en total). EL CPL se llevó a cabo durante este tratamiento crónico, y ambos finalizado el mismo día (PND 77). Las dosis diarias de topiramato se administraron en una habitación diferente a la utilizada en la prueba experimental (administración no contingente con el compartimento asociado a la droga). Los ratones adquirieron CPL durante el PND 73, 74, 75 y 76. Se establecieron los siguientes grupos experimentales: ChronicVeh+C25, n=12; ChronicTPM+C25, n=12.

#### **7.3.4.3. Experimento 3: Efecto del tratamiento crónico con topiramato (50 mg/kg/12h) en la extinción de CPL inducido por cocaína (25 mg/kg).**

Los ratones adquirieron CPL inducido por 25 mg/kg de cocaína durante los PND 54, 55, 56 y 57. Cuando comenzó la fase de extinción (PND 63), un tratamiento crónico de topiramato (TPM 50 mg/kg/dosis po) o vehículo se administró a los animales con el mismo procedimiento del experimento 2. Una vez extinguido el grupo control, después de 23 días de tratamiento (46 dosis en total), el experimento fue terminado.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales: C25+ExtVeh, n=13; C25+ExtTPM, n=14.

### **7.3.5. Análisis estadísticos**

En el experimento 1, el tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga durante el pre y post-condicionamiento se analizó por medio de un análisis mixto de varianza (ANOVA) con una variable entre - Tratamiento, con seis niveles (Veh+SAL, Veh+C1, Veh+C25, TPM50+Sal, TPM50+C1 y TPM50 C25) - y una variable intra -Días, con dos niveles (Pre-C y Post-C). Se considera que la preferencia se ha extinguido cuando el tiempo empleado por un grupo en el compartimento asociado con la droga es igual a la del Pre-C (analizado usando la prueba t de Student). El número de sesiones necesarias para la extinción de la preferencia en cada animal se analizó por medio de la prueba de Kaplan-Meier con comparaciones Breslow (Wilcoxon generalizada) cuando correspondieron. Aunque la media del grupo en su conjunto determinó el día en el que se consideró alcanzada la extinción, se consideró extinta la preferencia cuando un ratón pasó 380 segundos o menos en el compartimento asociado a la droga durante dos días consecutivos. Elegimos este tiempo basándonos en los valores de las pruebas Pre-C realizadas en el estudio (media=370 segundos). Cuando la preferencia no se extinguió en un animal, se le

### **Estudio 3**

asignó el número de días requeridos para la extinción grupo como un todo. Two-way ANOVA (Droga -salino y cocaína-, y tratamiento -vehículo y topiramato-) seguido por el método Newman-Keuls de Student's se utilizó para analizar la expresión del gen TH y DAT en el ATV.

En el experimento 2, se realizó un ANOVA con el fin de comparar medidas pre y post con una variable entre -Grupos, con dos niveles (ChronicVeh+C25 y ChronicTPM50+C25) - y una variable intra - Días, con dos niveles (Pre -C y Post-C). Las diferencias entre el tiempo dedicado por los ratones en el compartimento asociado a la droga en las pruebas de extinción o de reinstauración después de dosis *priming* se analizaron por medio de una "t" de Student (experimentos 1 y 2).

En el experimento 3, el tiempo invertido en el compartimento asociado con la droga durante el pre y post-condicionamiento se analizó mediante un ANOVA con una variable entre -Grupos, con dos niveles (C25+ExtVeh y C25+ExtTPM50) - y una variable intra - Días, con tres niveles (Pre-C, Post-C y Final). Se realizó un one-way ANOVA para garantizar que las puntuaciones del Post-C de ambos grupos no diferían en principio. Una corrección de Bonferroni se utilizó para las comparaciones post hoc. Todos los análisis se realizaron utilizando el

paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 para Windows (Systat Software Inc, Chicago, IL, EE.UU.).

### **7.3.6. Resultados**

*Experimento 1: Efecto del topiramato (50 mg/kg) en la adquisición y expresión del CPL inducido por diferentes dosis de cocaína.*

Los resultados de los efectos del topiramato sobre la adquisición de CPL se presentan en la Figura 1A. El ANOVA para el tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la droga durante el pre y post-C reveló un efecto significativo de la variable Días [ $F(1,56)=8.894$ ;  $p<0.004$ ] y la interacción Días x Tratamientos [ $F(5,56)=5.086$ ;  $p<0.001$ ]. Sólo el grupo Veh+C25 ( $p<0.04$ ) y el grupo TPM50+C25 ( $p<0.0001$ ) pasaron más tiempo en el compartimento asociado con la droga en Post-C que en el Pre-C. Estos resultados indican que los únicos grupos que recibieron cocaína 25 mg /kg más topiramato o vehículo adquirieron CPL. En los animales condicionados con TPM50+C25 el resultado del Post-C fue más elevado que en el del grupo condicionado con Veh+C25 ( $p<0.031$ ). No se observaron diferencias entre los grupos en las puntuaciones de Pre-C.

### **Estudio 3**

El tiempo necesario para la extinción de la preferencia después del condicionamiento y después de cada una de las dosis *priming* de cocaína se presentan en la Figura 1B. El análisis de Kaplan-Meier de los datos registrados después de la prueba post-C para cada ratón en cada grupo reveló que se requiere un mayor número de sesiones para lograr la extinción después del Post-C en los animales del grupo TPM50+C25 que en los Veh+C25 ( $\chi^2=6.342$ ;  $p<0.012$ ). La preferencia se reinstauró con una dosis *priming* de 12.5 mg/kg de cocaína en el grupo Veh+C25 [ $t(8)=-2.708$ ;  $p<0.027$ ], y en TPM50+C25 [ $t(9)=-2.685$ ;  $p<0.031$ ]. El grupo Veh+C25 extinguió. Sin embargo, el grupo TPM50+C25, que restableció CPL con 12.5 mg/kg de cocaína, no se extinguió cuando el experimento finalizó. El análisis de Kaplan-Meier de los datos registrados por cada ratón en cada grupo tras la reinstauración con 12.5 mg/kg de cocaína reveló que se requiere un mayor número de sesiones para lograr la extinción después de la reinstauración en los animales del grupo TPM50+C25 que en los Veh+C25 ( $\chi^2 = 4.689$ ;  $p < 0.03$ ).

*Análisis en el ATV de la expresión génica de la tirosina hidroxilasa (TH) y el transportador de dopamina (DAT).*

Los experimentos en tiempo real de la PCR revelaron que COC produjo una disminución significativa de la expresión génica TH en el ATV de



los ratones tratados con VEH en comparación con los que recibieron SAL. Curiosamente, este efecto fue significativamente mayor cuando los ratones administrados con SAL o COC durante las sesiones de CPL fueron tratados con TPM (Figura 2A, two-way ANOVA seguido por el método de Student-Newman-Keuls, drogas:  $F(1,31)=0.235$ ,  $p<0.631$ , tratamiento:  $F(1,31)=33.513$ ,  $p<0.001$ , y fármaco x tratamiento:  $F(1,31)=7.402$ ,  $p<0.010$ ). Por otro lado, la expresión génica del DAT en el ATV se redujo significativamente con COC en los ratones tratados con VEH. El tratamiento con TPM en ratones que recibieron SAL o COC durante el CPL indujo una disminución significativa y más pronunciada de los niveles de DAT en el ARNm (Figura 2B, la droga:  $F(1,31)=46.855$ ,  $p<0.001$ , tratamiento:  $F(1,31)=2.001$ ,  $p<0.170$ , y fármaco x tratamiento:  $F(1,31)=3.524$ ,  $p<0.07$ ). Los resultados del efecto del topiramato sobre la expresión del CPL se pueden observar en la figura 1C. El ANOVA realizado para evaluar el tiempo invertido en el compartimento asociado a la droga durante las fases de Pre- y Post-C reveló un efecto significativo de la variable Días [ $F(1,17)=16.250$ ;  $p<0.001$ ], pero no presentó interacción Días y Tratamiento [ $F(1,17)=0.779$ ; n.s.], dado que se observó un aumento en el tiempo invertido en el compartimento asociado a la droga en la fase de Post-C en ambos grupos (tanto en los que recibieron TPM, como en los que recibieron VEH antes del test del Post-C) presentando así CPL inducida por cocaína 25 mg/kg ( Grupo Vehículo:  $F(1,17)=4.709$ ;  $p<0.04$ ; Grupo TPM  $F(1,17)=12.743$ ;  $p<0.002$ )

### Estudio 3

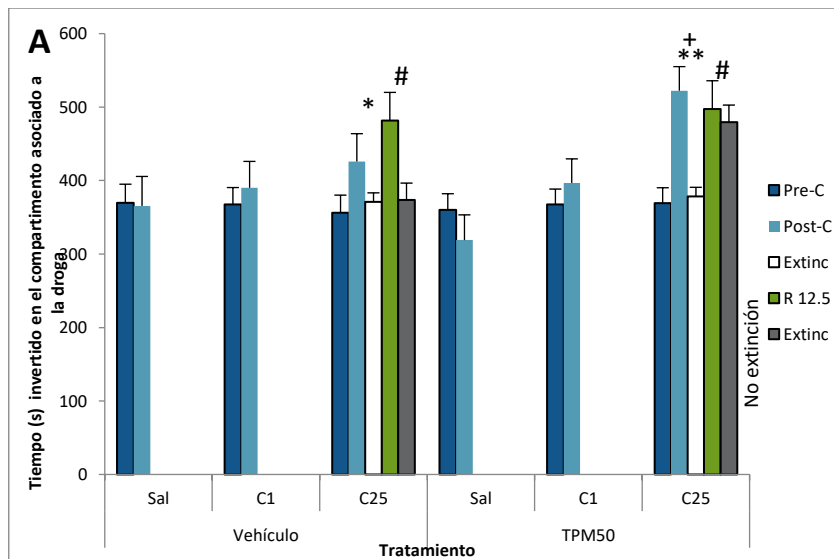
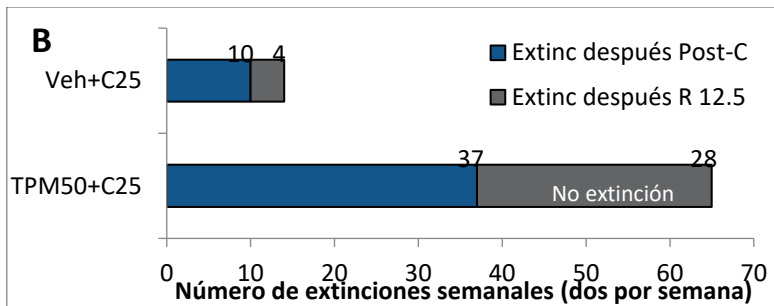
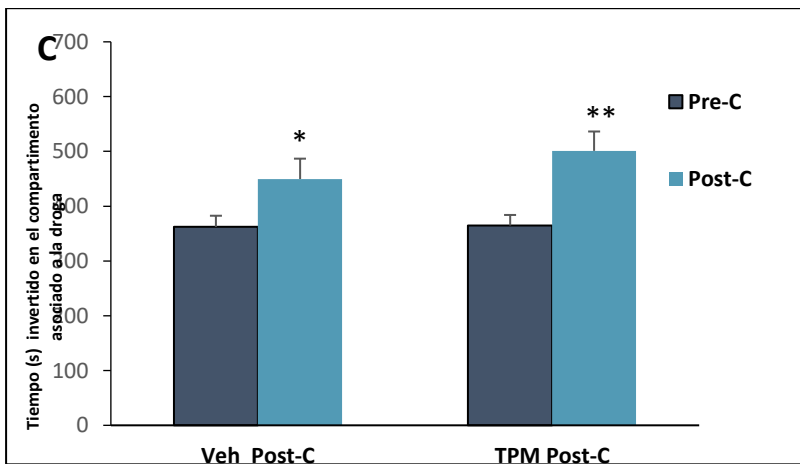


Figura 1. Efectos de topiramato (50 mg / kg) sobre la adquisición y expresión del CPL inducido por cocaína. A: Las barras representan la media ( $\pm$  error estándar de la media) d el tiempo en segundos transcurridos en el compartimento asociado a la droga durante el Pre-C (azul oscuro), Post-C (azul claro), la última sesión de extinción del Post-C (blanco), reinstauración (verde) y la última sesión de extinción de la reinstauración de C12.5 (gris). Los valores son la media  $\pm$  SEM. Los ratones recibieron una dosis de VEH o TPM 50 mg/kg po 60 minutos antes de la inyección de cocaína (0, 1 ó 25 mg/kg). La dosis priming utilizadas en el grupo Veh+Coc25 fue cocaína 12.5 mg/kg. Las dosis priming utilizadas en el grupo TPM50+C25 fue TPM50 mg/kg y cocaína 12.5 mg/kg; la extinción no se produjo en este grupo. \*\* $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C, \* $p < 0.05$  Pre-C vs. Post-C, # $p < 0.05$  Ext vs reinst, + $p < 0.05$  Post-C Veh+C25 vs. Post-C TPM50+C25.



B: Las barras representan el número de sesiones necesarias para la extinción de la preferencia inducida por 25 mg/kg de cocaína después del Post-C (azul), o por la reinstauración de la preferencia con 12.5 mg/kg (gris). Los valores representan el número de días necesarios para todo el grupo para lograr la extinción.



C: Las barras representan la media ( $\pm$  error estándar de la media) del tiempo en segundos transcurridos en el compartimento asociado a la droga durante el Pre-C (azul oscuro) y el Post-C (azul claro) en el CPL inducido por cocaína 25 mg/kg. Los ratones recibieron una dosis de TPM 50 mg/kg o VEH 60 minutos antes de la sesión de Post-C. \*\* $p < 0.000$  Pre-C vs. Post-C, \* $p < 0.05$  Pre-C vs. Post-C.

### Estudio 3

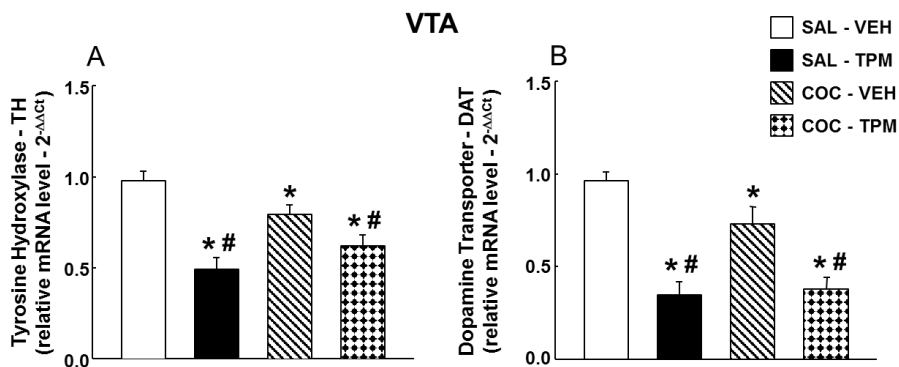


Figura 2. Expresión génica de la TH y la DAT en el ATV de los animales del experimento 1. Los datos están expresados como media  $\pm$  SEM (n=8 animales por grupo). \* $p < 0.05$  vs. grupo SAL-VEH. # $p < 0.05$  vs. grupo COC-VEH (método de Student-Newman-Keuls).

*Experimento 2: Efecto del tratamiento crónico con topiramato (50 mg/kg/12 h) en la adquisición de CPL inducido por cocaína (25 mg/kg).*

Los resultados del tratamiento crónico con topiramato sobre la adquisición de CPL inducido por cocaína se presentan en la Figura 3A. El ANOVA reveló un efecto significativo de la variable Días [ $F(1,22)=33.474$ ;  $p < 0.0001$ ], ya que se dedicó más tiempo en el compartimento asociado con la droga en las pruebas Post-C que en el Pre-C ( $p < 0.0001$ ); y la interacción Días x Tratamiento [ $F(1,22)=5.899$ ;  $p < 0.024$ ]. Aunque ambos grupos pasaron más tiempo en el compartimento asociado a la droga en Post-C que en Pre-C

(ChronicVeh+C25,  $p < 0.027$ ; y ChronicTPM+C25,  $p < 0.0001$ ), la puntuación de Post-C de los ratones ChronicTPM+C25 era más alta que la de ChronicVeh+C25 ( $p < 0.037$ ). No se observaron diferencias entre los grupos en las puntuaciones de Pre-C. La evolución del proceso de extinción en estos grupos está representada en la Fig. 3B. La preferencia fue reinstaurada en el grupo ChronicVeh+C25 [ $t(9) = -2.806$ ;  $p < 0.021$ ], y en ChronicTPM+C25 [ $t(10) = -2.198$ ;  $p < 0.05$ ] después de una dosis *priming* de cocaína 12.5 mg/kg. El grupo ChronicTPM+C25 reinstaurado con una dosis *priming* de 6.25 mg/kg de cocaína [ $t(10) = -3.013$ ;  $p < 0.013$ ], mientras que el otro grupo no lo hizo.

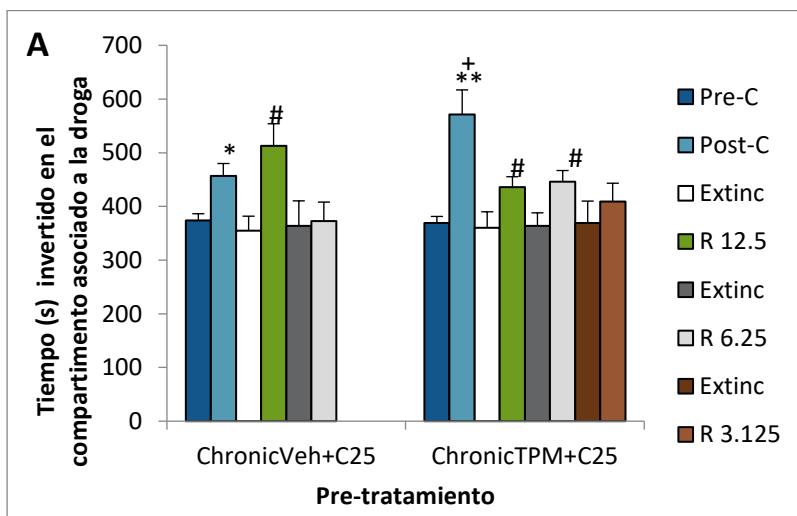
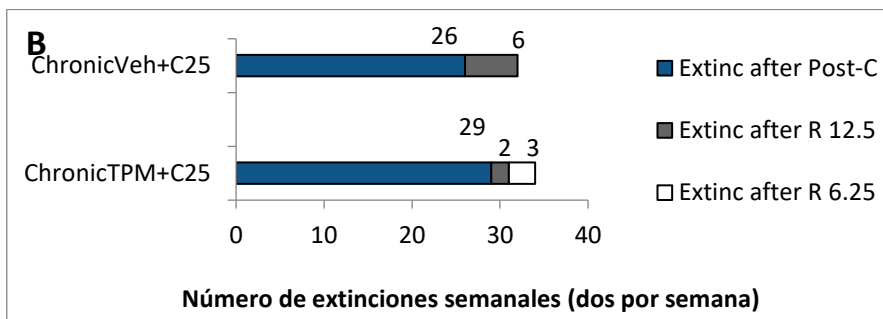


Figura 3. Efecto del tratamiento crónico con topiramato (100 mg/kg/día) en la adquisición de CPL inducido por cocaína (25 mg/kg). Los animales comenzaron un tratamiento crónico de topiramato 50 mg/kg/dosis o po vehículo en el PND 55 con un procedimiento de dos administraciones diarias separadas por un intervalo de 12 horas, y

### Estudio 3

administrado en una habitación iluminada todos los días a la semana, con una duración total de 23 días (15 días antes del condicionamiento con cocaína 25 mg/kg y 8 días durante el condicionamiento, 46 dosis totales). A: Las barras representan la media ( $\pm$  SEM) tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga antes de las sesiones de condicionamiento (azul oscuro), después de las sesiones de condicionamiento (azul claro), el tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la droga en la última sesión de extinción (blanco) y el tiempo dedicado en el compartimento asociado con la droga en la prueba de reinstauración inducida con cocaína (verde). Las dosis priming utilizadas en el grupo ChronicVeh+C25 fueron cocaína 12.5 y 6.25 mg/kg. Las dosis utilizadas en el grupo ChronicTPM+C25 fueron cocaína 12.5, 6.25 y 3.125 mg/kg. \*\* $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C, \* $p < 0.05$  Pre-C vs. Post-C, # $p < 0.05$  Extinc vs reinst, + $p < 0.05$  Post-C ChronicVeh+C25 vs. Post-C ChronicTPM + C25.



B: Las barras representan el número de sesiones de extinción necesarias para la extinción de la preferencia inducida por cocaína 25 mg/kg después de la prueba post-C (azul), o por la preferencia reinstaurada a 12,5 (gris) o 6,25 mg/kg (blanco). Los valores representan el número de días necesarios para lograr la extinción todo el grupo. La preferencia se consideró extinta cuando el tiempo

empleado por un grupo en el compartimento asociado a la droga fue igual al Pre-C.

*Experimento 3: Efecto del tratamiento crónico con topiramato (50 mg/kg/12 h) en la extinción de CPL inducido por cocaína (25 mg/kg).*

Los resultados del tratamiento con topiramato (50 mg/kg/12h) en la extinción del CPL inducido por cocaína se presentan en la Figura 4. El ANOVA mostró un efecto significativo de Días [ $F(2,50)=9.86$ ;  $p<0.0001$ ] y la interacción Tratamiento x Días [ $F(2,50)=3.821$ ;  $p<0.029$ ], lo que indica que todos los animales pasaron más tiempo en el compartimento asociado a la droga en Post-C que en Pre-C (C25+ExtVeh,  $p<0.005$  y C25+ExtTPM,  $p<0.0001$ ). Además, los ratones C25+ExtTPM pasaron más tiempo en el compartimento asociado a la droga en Post-C de ese grupo C25 ExtVeh ( $p<0.036$ ) hasta el final del tratamiento. Mientras el grupo C25+ExtTPM continuó mostrando diferencias ( $p<0.049$ ), el grupo C25+ExtVeh mostró CPL extinguido, y por lo tanto se terminó el experimento. No se observaron diferencias entre los grupos en el Pre-C.

### Estudio 3

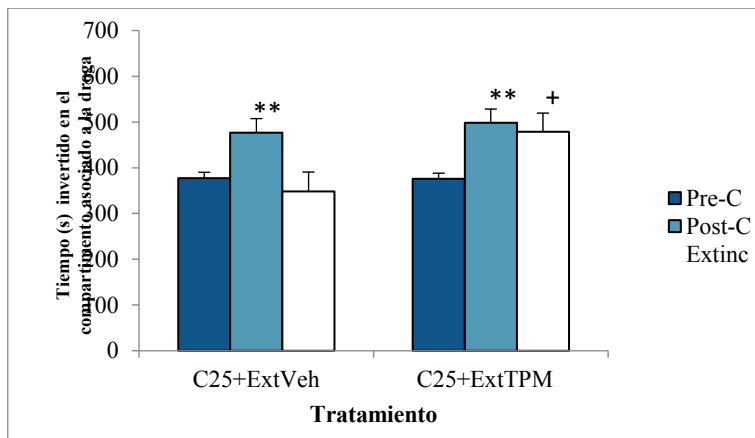


Figura 4. Efecto del tratamiento con topiramato (100 mg/kg/día) sobre la extinción de CPL inducido por la cocaína (25 mg/kg). Cuando finalizó el CPL, se inició la fase de extinción (PND 63) y los animales comenzaron un tratamiento con topiramato (TPM 50 mg/kg/dosis po) o vehículo con un procedimiento de 2 administraciones diarias separados por un intervalo de 12 horas administrados en una habitación iluminada, todos los días de la semana, con una duración total de 23 días (46 dosis en total). Una vez que el grupo de control extinguió, después de 23 días de tratamiento, se terminó el experimento. Las barras representan la media ( $\pm$  SEM) del tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga antes de las sesiones de condicionamiento (azul oscuro), después de las sesiones de condicionamiento (azul claro), y la última sesión de la extinción (blanco). \*\*  $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C, + $p < 0.05$  Fin tratamiento TPM vs Fin tratamiento Veh.

#### 7.3.7. Discusión

El presente estudio aporta evidencias en contra del uso del topiramato en el tratamiento de la dependencia a la cocaína. Esta afirmación está



apoyada por los siguientes resultados: 1) el topiramato incrementa de manera significativa el CPL inducido por la cocaína (25 mg/kg), y retrasa o bloquea el proceso de extinción en todos los tipos de administración analizados (fases de condicionamiento, pre-condicionamiento y extinción); y 2) el topiramato induce cambios en procesos relevantes en los efectos reforzantes de la cocaína (TH y DAT en el ATV).

El tratamiento de trastornos relacionados con el consumo de cocaína está basado en aproximaciones tanto farmacológicas como psicoterapéuticas, pero los resultados positivos de estos tratamientos son insuficientes, ya que una proporción elevada de pacientes necesita reanudar el tratamiento dentro del primer año. En base a estas circunstancias se puede afirmar que no existe, actualmente, un tratamiento específico farmacológico efectivo en el tratamiento de la dependencia a la cocaína. En los últimos años, el topiramato se ha perfilado como una sustancia con potencial para el tratamiento de la dependencia a la cocaína. Aun así, existen resultados controvertidos que ponen en duda su verdadera eficacia, tanto en investigaciones preclínicas (Echeverry-Alzate y cols., 2014; Gasior y cols., 1999; Le Foll y cols., 2008) como clínicas (Johnson y cols., 2013b; Kampman y cols., 2004; Reis y cols., 2008).

### **Estudio 3**

En este estudio se evaluaron los efectos del topiramato sobre las propiedades reforzantes de la cocaína en el modelo de CPL, usando tres aproximaciones experimentales. El topiramato fue administrado 1) durante las 4 sesiones de condicionamiento (0, 1, 25 mg/kg, i.p.) y previo a la sesión de post condicionamiento del CPL inducido por cocaína 25 mg/kg; 2) dos semanas previas, y durante el CPL de cocaína (25 mg/kg); y 3) durante la fase de extinción del CPL inducido por cocaína (25 mg/kg). En el primer experimento, la administración de topiramato aumentó de manera significativa el CPL inducido por la dosis de 25 mg/kg de cocaína, y bloqueó el proceso de extinción con respecto a los animales solo tratados con cocaína. Estos resultados sugieren que el topiramato incrementa de manera significativa las propiedades reforzantes de la cocaína, y no consigue reducir la expresión de la conducta de búsqueda en el CPL. Estudios previos parecen ir en línea con nuestros resultados, demostrando que el topiramato no consigue reducir la respuesta a la cocaína (Echeverry-Alzate y cols., 2014; Le Foll y cols., 2008), y no es capaz de prevenir las convulsiones inducidas por la cocaína en roedores (Gasior y cols., 1999).

Por otro lado, ninguno de los grupos condicionados con una dosis no efectiva de cocaína (1 mg/kg) – con o sin administración contingente de topiramato- presentaron CPL. Por ello, podemos afirmar que el topiramato no incrementa los efectos reforzantes de una dosis

subumbral de cocaína. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que esta dosis no es efectiva induciendo CPL en animales *naive* (Maldonado y cols., 2006; Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014; Montagud-Romero y cols., 2014; Mateos-García y cols., 2015; Rodríguez-Arias y cols., 2015). Además, el topiramato administrado en solitario ha demostrado no tener propiedades motivacionales, lo cual está en concordancia con los resultados de otro estudio que observó que el topiramato no tiene efectos reforzantes ni aversivos observados en el CPL con roedores (Tatsuta y cols., 2007).

También se analizaron las alteraciones en la expresión de los genes TH y DAT en el ATV, muy relacionados ambos con el sistema de refuerzo, con el objetivo de analizar los mecanismos subyacentes del topiramato sobre el CPL inducido por cocaína. Los resultados mostraron que la cocaína redujo de manera significativa la expresión de ambos genes en el ATV. Estudios previos sí mostraron que la administración aguda de cocaína incrementa los niveles de expresión génica de la TH y DAT en diferentes áreas cerebrales, incluyendo el ATV y el NAcc (Balda y cols., 2009; Belin y cols., 2007; Darland y cols., 2012). Estas diferencias en los resultados pueden deberse al tipo de administración de cocaína aplicada (crónica vs. aguda), la dosis empleada o la raza empleada (ratas, ratones, pez cebra). Además, la administración de topiramato produce una mayor reducción de la expresión génica de la TH y la DAT, y este efecto no fue dependiente de la administración de cocaína, ya

### ***Estudio 3***

que se obtuvo una reducción similar en los grupos de TPM+salino y TPM+cocaína. Este efecto, mediado por el TPM, fue asociado con un incremento significativo en el CPL inducido por una dosis efectiva de cocaína, mientras que el grupo de TPM+salino no presentó cambios. Consideramos que existe la necesidad de más experimentos que clarifiquen el mecanismo exacto del TPM. Se puede hipotetizar que estas alteraciones pueden deberse a mecanismos indirectos (modulación de los receptores GABAérgicos y /o glutamatérgicos), ya que estudios previos no han observado una interacción directa con el sistema de refuerzo dopaminérgico (Braga y cols., 2009; Johnson, 2005).

Teniendo en cuenta diferentes estudios, el patrón de administración del TPM puede producir resultados diferentes. En este sentido, la administración aguda de TPM reduce algunos aspectos de la impulsividad motora, como la ansiedad, la búsqueda de la novedad o la impaciencia, así como la administración crónica de TPM reduce algunos aspectos de la impulsividad cognitiva (Navarrete y cols., 2012b). Por otro lado, una administración aguda (1-5 días) mostró una reducción de los efectos reforzantes del etanol en un modelo de autoadministración oral, mientras que dicho efecto no se dio con dosis adicionales (6-10 días) (Moore y cols., 2014). El segundo experimento, con objetivo de evaluar una dosis crónica de topiramato (23 días, dos veces al día) produjo diferentes resultados ue los obtenidos cuando el

topiramato fue administrado solo previamente antes de las sesiones de condicionamiento. Como se puede observar en la figura 3, el efecto del topiramato fue similar al observado en el diseño experimental previo: incremento del CPL inducido por cocaína, así como retraso en el proceso de extinción. Los ratones pre-tratados con topiramato fueron sensibles a una dosis *priming* más baja, tras la obtención de la extinción de la conducta de búsqueda (última reinstauración con una dosis de 6.25 mg/kg), comparados con los animales que fueron pre-tratados con vehículo (última reinstauración con una dosis de 12.5 mg/kg). Estos datos sugieren que el topiramato no solo incrementa las propiedades reforzantes de la cocaína, sino que también sensibiliza el sistema de refuerzo y aumenta la reinstauración inducida con una dosis *priming*.

Además, en el tercer experimento pudimos observar como la administración crónica de topiramato comenzada tras la fase de Post-C, bloqueó la extinción del CPL inducido por cocaína, cosa que no sucedió en los ratones tratados con vehículo. Estos efectos pueden deberse al bloqueo de los procesos de extinción o a un incremento en el efecto de las claves asociadas con la administración de cocaína. Estudios previos mostraron que el topiramato aumenta la sensación de euforia y los efectos estimulantes asociados con la cocaína (Kampman y cols., 2013) y los efectos reforzantes de la nicotina (Reid y cols., 2007), así como un aumento de la euforia y la estimulación

### ***Estudio 3***

inducida por la metanfetamina (Johnson y cols., 2007), efectos que pueden estar asociados el fracaso en el mantenimiento de la abstinencia y evitando la recaída. Además, aunque el topiramato ha reducido el craving en sujetos dependientes a la cocaína, es importante señalar que solo una minoría se han mantenido abstinentes (Reis y cols., 2008).

A pesar de que varios estudios han apuntado el topiramato como una posible opción terapéutica en el tratamiento de la dependencia a la cocaína, también existe evidencia clínica que indica sus limitaciones (Umbricht y cols., 2014). Una revisión Cochrane reciente de veinte estudios y con 2068 participantes, apuntó que la evidencia empírica actual no apoya el uso clínico de medicación anticonvulsivante (como es el topiramato) en el tratamiento de dependientes a la cocaína. Los autores indican además que los anticonvulsivantes no deben ser un grupo farmacológico tenidos en cuenta como primera, segunda, o tercera línea de tratamiento de la dependencia a la cocaína (Minozzi y cols., 2015). Además, también es importante señalar que la eficacia del topiramato ha estado muy ligada al empleo regular de terapia cognitivo-conductual (Nuitjen y cols., 2014; Johnson y cols., 2013a; Reis y cols., 2008), así como puede aumentar la euforia y los efectos estimulantes de bajas dosis de cocaína (Johnson y cols., 2013b). De hecho, la División de Farmacoterapia de la Universidad de Texas ha recomendado recientemente que el topiramato no sea utilizado como

primera línea de tratamiento de la dependencia a la cocaína, basándose en la limitada y contradictoria evidencia científica, y su uso debe ser limitado a ciertos casos y en combinación con terapia cognitivo-conductual (Blaze, 2015).

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que el topiramato potencia los efectos reforzantes de la cocaína incrementando el condicionamiento, así como bloqueando o retrasando el proceso de extinción. Estos datos son una importante aportación a la evidencia clínica actual, y cuestiona la utilidad terapéutica para el tratamiento de la dependencia a la cocaína. Aunque es necesaria más investigación preclínica para poder clarificar la interacción entre el topiramato y la cocaína nuestros resultados, junto con estudios previos, sugieren que es recomendable la limitación del uso del topiramato en pacientes dependientes a la cocaína.







## Topiramate increases the rewarding properties of cocaine in young-adult mice limiting its clinical usefulness

M. C. Arenas<sup>1</sup> · A. Mateos-García<sup>1</sup> · C. Manzanedo<sup>1</sup> · M. Rodríguez-Arias<sup>1,2</sup> · M. A. Aguilar<sup>1,2</sup> · F. Navarrete<sup>2,3</sup> · M. S. García Gutiérrez<sup>2,3</sup> · J. Manzanares<sup>2,3</sup> · J. Miñarro<sup>1,2</sup>

Received: 25 February 2016 / Accepted: 16 August 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

### Abstract

**Rationale** Topiramate is an anticonvulsant drug which has been evaluated as a therapeutic option for the treatment of cocaine addiction during the last decade.

**Objectives** The purpose of this study was to evaluate the effects of topiramate on the reinforcing actions of cocaine. To this aim, the topiramate-mediated regulation of acquisition and extinction phases of the cocaine conditioned place preference (CPP) was assessed in young-adult mice using three experimental designs.

**Methods** Topiramate (50 mg/kg, p.o.) was given as follows: (1) during cocaine (1 and 25 mg/kg, i.p.) conditioning sessions (4 days) and cocaine (25 mg/kg) post-conditioning session; (2) 2 weeks before and during cocaine conditioning (25 mg/kg); and (3) during extinction of CPP induced by cocaine (25 mg/kg). In the first experimental design, changes in tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT) gene expressions were measured in the ventral tegmental area (VTA).

**Results** Topiramate significantly increased cocaine-induced CPP and delayed or failed to produce extinction after the first cocaine reinstatement extinction in the first and second

experiments. Furthermore, treatment with topiramate after place conditioning blocked the extinction of cocaine-induced CPP. TH and DAT gene expression in the VTA was significantly lower both with topiramate alone and in combination with cocaine compared with animals receiving only cocaine.

**Conclusions** These findings suggest that topiramate increases the rewarding properties of cocaine, at least in part, by regulating dopaminergic signaling in the mesolimbic circuit. Consequently, the results of this study do not support the use of topiramate for the treatment of problems related to cocaine dependence.

### Highlights

- Topiramate increases the rewarding properties of cocaine in CPP
- Topiramate alters dopaminergic signaling in the mesolimbic circuit
- Topiramate delays the extinction of cocaine-induced CPP
- TH and DAT gene expression in the VTA decreases with topiramate and/or with cocaine
- Results show that it should limit the use of topiramate in cocaine-dependent subjects

**Keywords** Topiramate · Cocaine · CPP · Reward effects · Ventral tegmental area · Mice

✉ M. C. Arenas  
carmen.arenas@uv.es

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de València, Avda. Blasco Ibañez, 21, 46010 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS-Trastornos Adictivos), Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. Ramón y Cajal s/n, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain

### Introduction

Cocaine addiction is a chronic disorder characterized by repeated relapse to compulsive drug use associated with medical and psychosocial complications, and hence represents a major public health problem (Karila et al. 2008; UNODC 2014). Nowadays, no specific effective pharmacological treatment exists for cocaine dependence, withdrawal symptoms or relapse prevention (EMCDDA 2007; Kim and Lawrence 2014).

Therefore, there is a critical need to evaluate new pharmacotherapeutic tools for the management of cocaine dependence (Gass and Olive 2008; Kim and Lawrence 2014).

Topiramate is an anticonvulsant drug which has been evaluated as a therapeutic option for the treatment of cocaine addiction during the last decade (Karila et al. 2008; Gass and Olive 2008; Lin 2013; Johnson et al. 2013a; Kim and Lawrence 2014; Minozzi et al. 2015). The main neuropharmacological actions of topiramate are facilitation of GABA neurotransmission and blockade of AMPA/kainate glutamate receptors, which have been related to its potential to produce neural stabilization and reduce downstream dopaminergic mesolimbic activity, and support its usefulness in attenuating the reinforcing and rewarding properties of drugs of abuse (Johnson 2004, 2005; Reis et al. 2008; Johnson et al. 2013a and 2013b). Topiramate treatment has been associated with a clinically manifested improvement in the severity of cocaine dependence in humans, proving to be more effective than a placebo in increasing the probability of cocaine abstinence (Kampman et al. 2004; Johnson et al. 2013a), decreasing craving in cocaine dependents (Reis et al. 2008; Johnson et al. 2013a and 2013b), and reducing relapse to cocaine use (Kampman et al. 2004). However, other studies have failed to find clear indications of topiramate's efficacy in the treatment of crack-cocaine-dependent patients (Nuijten et al. 2014), in preserving abstinence among cocaine users (Reis et al. 2008; Umbricht et al. 2014), and in reducing cocaine craving/use (Kampman et al. 2013; Umbricht et al. 2014). In addition, the efficacy of topiramate has been linked with regular cognitive-behavioral therapy (Johnson et al. 2013a; Reis et al. 2008; Kim and Lawrence 2014). Therefore, the results across clinical studies are controversial and the therapeutic usefulness of topiramate for cocaine-dependence management is currently questionable (Minozzi et al. 2015).

Few pre-clinical studies had evaluated the effects of topiramate on the rewarding properties of cocaine in animal models, and their results have offered little clarification. Although topiramate has been shown to reduce cocaine self-administration (Johnson 2005; Karila et al. 2008) and to inhibit the cocaine-induced increase of ethanol self-administration (Echeverry-Alzate et al. 2014), the administration of a single dose neither blocks cocaine-induced psychomotor stimulation (Echeverry-Alzate et al. 2014), nor reduces discrimination of the effects of cocaine (Le Foll et al. 2008). In this way, further studies are needed to understand the possible therapeutic usefulness of topiramate for treating cocaine dependence.

Consequently, the aim of this study was to evaluate the efficacy of topiramate in blocking the rewarding effects of cocaine in young-adult mice. For this purpose, we employed the conditioned place preference (CPP) paradigm, because this paradigm has been extensively used to investigate the motivational effects of abused drugs (Tzschentke 2007) and

to assess the extinction and reinstatement phases of relapse to drug-seeking (Aguilar et al. 2009) in animal models. Therefore, the effect of the administration of topiramate on the cocaine-induced acquisition, expression and extinction phases of CPP in mice was evaluated. In addition, real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments were performed to evaluate the neurobiological mechanisms underlying topiramate actions on cocaine reward. Gene expression changes of tyrosine hydroxylase (TH) and the dopamine transporter (DAT), targets closely related with cocaine-induced reinforcement (Balda et al. 2009; Belin et al. 2007; Darland et al. 2012), were analyzed in the ventral tegmental area (VTA) of animals treated with TPM or a vehicle during place conditioning sessions.

## Material and methods

### Animals

A total of 164 male mice of the OF1 strain (Charles River, Barcelona, Spain) were employed. The animals arrived at the laboratory on postnatal day (PND) 42 and were housed in groups of four in plastic cages (28 cm length × 28 cm width × 14.5 cm height) under the following conditions: constant temperature ( $21 \pm 2$  °C), a relative humidity of 60 %, a 12-h light non-reverted light cycle (lights on from 8:00 to 20:00), and food and water available ad libitum (except during behavioral tests). Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional, and local laws and regulations, which are in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The Animal Use and Care Committee of the University of Valencia approved the study protocol.

### Drugs

Topiramate (Topamax<sup>®</sup> by Janssen-Cilag, Madrid, Spain) was freshly prepared each day before testing and was dissolved in distilled water. In all the experiments, topiramate was administered p.o. in a volume of 0.005 ml/g. Cocaine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber S.A., Madrid, Spain) was diluted in physiological saline (0.9 % NaCl) and administered i.p. in a volume of 0.01 ml/g. Saline and distilled water were used as a vehicle.

### Apparatus

The eight identical Plexiglas boxes employed for the conditioned place preference (CPP) test have two equally sized compartments (30.7 cm length × 631.5 cm width × 634.5 cm height) separated by a gray central area (13.8 cm

length  $\times$  631.5 cm width  $\times$  634.5 cm height). The compartments have different colored walls (black vs white) and distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one). Four infrared light beams in each compartment of the box and six in the central area allowed the recording of the position of the animal and its crossings from one compartment to the other. The equipment was controlled by two IBM PC computers using MONPRE 2Z software (CIBERTEC, SA, Spain).

## Procedures

### Conditioned place preference procedure

The procedure, unbiased in terms of initial spontaneous preference, was performed as described previously (Manzanedo et al. 2001).

**Acquisition** Animals were handled briefly on each of the 3 days preceding initiation of the CPP, which consisted of three phases that took place during the light cycle. In the first phase, the animals were allowed access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) per day on three consecutive days. On day 3, the time spent by an animal in each compartment during a period of 900 s was recorded. In each group, half the animals received the drug or vehicle in one compartment and the other half in the other compartment. After assigning the compartments, an analysis of variance revealed no significant difference between the time spent in the drug-paired vs. vehicle-paired compartments during the pre-conditioning (Pre-C) phase. In the second phase (conditioning), animals were conditioned with cocaine through four pairings with the respective compartment. All animals underwent two pairings per day, one of cocaine and another with vehicle. The animals received an injection of cocaine (0, 1 or 25 mg/kg) and, immediately after, were confined to the drug-paired compartment for 30 min. Later, they received an injection of physiological saline after an interval of 4 h immediately before confinement to the vehicle-paired compartment for 30 min. The central area was made inaccessible during conditioning by lowering the guillotine doors. During the third phase, or post-conditioning (Post-C), the guillotine doors separating the two compartments were removed and the time spent by the untreated mice in each compartment during a period of 900 s was recorded. The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and the time spent in the same compartment in the Pre-C test is considered to be a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive, then the drug has induced a preference for the drug-paired compartment, whereas the opposite indicates the development of an aversion. The doses selected to induce CPP were based

on previous studies (Maldonado et al. 2006; Manzanedo et al. 2012).

**Extinction** After the Post-C test, the mice underwent an extinction session twice a week, which consisted of placing the animals in the apparatus (without guillotine doors separating the compartments) for a period of 15 min until the time spent in the drug-paired compartment by each group of animals was similar to that recorded in the Pre-C session. Thus, all the animals in each group received the same number of extinction sessions, independently of their individual scores, since the extinction criterion was a lack of significant differences with respect to the Pre-C values of the group. Extinction of CPP was always confirmed in a subsequent session 24 h after the last extinction session.

**Reinstatement** The effects of a priming dose of cocaine were evaluated 24 h after extinction had been confirmed. Reinstatement tests were the same as those carried out in Post-C (free ambulation for 15 min), except that animals were tested 15 min after administration of the respective dose of cocaine. When reinstatement of the preference was achieved, after a subsequent extinction process, a new reinstatement test was conducted with progressively lower doses of the drug (half of the dose used in the previous priming).

### Real-time PCR

Total RNA was isolated from frozen ( $-80$  °C) VTA micropunches with Tri Reagent (Life Technologies) and subsequently retrotranscribed to cDNA. TH and DAT gene expression was assessed by real-time PCR in the VTA of mice from experiment 1 exposed to place conditioning with saline (SAL) or cocaine (COC, 25 mg/kg) and treated with a vehicle (VEH) or topiramate (TPM, 50 mg/kg). Quantitative analysis of gene expression was measured with the following TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assays: "Mm\_00447546m1" for TH and "Mm00438388\_m1" for DAT (Life Technologies). Real-time PCR experiments were performed on the StepOne Plus system (Life Technologies) and the reference gene used was Rn18S rRNA, which was detected with TaqMan<sup>®</sup> ribosomal RNA control reagent "Mm03928990\_g1". Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold-change in target gene mRNA abundance was determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen 2001).

### Experimental design

After an acclimatization period of at least 5 days, the animals started the specific experimental procedures for each experiment (see Fig. 1 for a more detailed description). The effects of administration of topiramate (50 mg/kg) on the acquisition

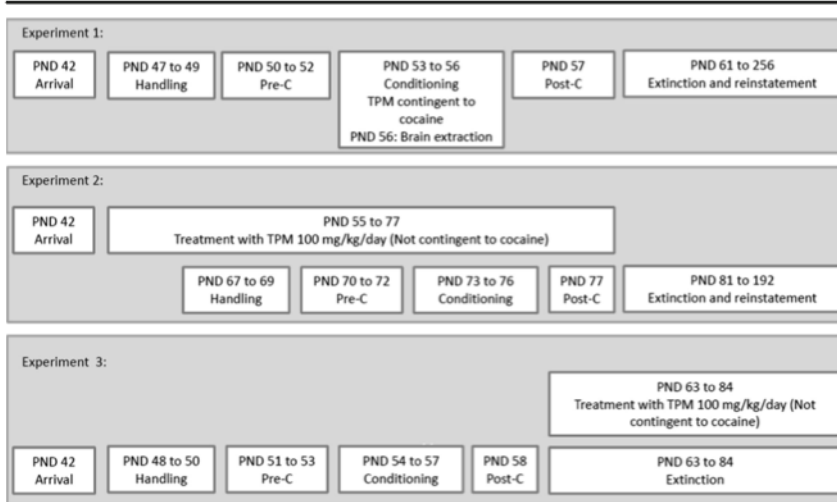


Fig 1 Experimental design

of CPP induced by several doses of cocaine (0, 1 and 25 mg/kg) in mice was evaluated in experiment 1. Subsequent real-time PCR experiments to analyze gene expression changes of TH and DAT in the VTA were performed. In experiment 2, the effect of a previous chronic treatment with topiramate (50 mg/kg/12 h) on the acquisition of CPP induced by cocaine (25 mg/kg) was assessed. Lastly, in experiment 3, the efficacy of chronic topiramate treatment (50 mg/kg/12 h) on extinction of the CPP induced by cocaine (25 mg/kg) was examined. The dose of topiramate was based on previous studies, since administration of 50 mg/kg/12 h of topiramate (p.o.) was previously shown to be effective in blocking motor signs and reducing anxiety-like behavior in mice with spontaneous cannabinoid withdrawal (Aracil-Fernández et al. 2013), and to decrease anxiety and the impulsivity of naive mice in a delayed reinforcement task (Navarrete et al. 2012a y 2012b).

**Experiment 1: effect of topiramate (50 mg/kg) on acquisition and expression of the CPP induced by different doses of cocaine** Animals ( $n = 94$ ) received a dose of the vehicle or topiramate 50 mg/kg (p.o.) and were returned immediately to their home cages. Subsequently, 60 min later after each administration, the animals received an injection of cocaine (0, 1, or 25 mg/kg, i.p.) and were confined to the drug-paired compartment. This procedure was carried out during the 4 days of conditioning (PND 53, 54, 55, and 56). The following experimental groups were established: Veh + Sal,  $n = 8$ ; Veh

+ C1,  $n = 10$ ; Veh + C25,  $n = 9$ ; TPM50 + Sal,  $n = 11$ ; TPM50 + C1,  $n = 12$ , and TPM50 + C25,  $n = 12$ .

Other mice ( $n = 19$ ) received an injection of cocaine (25 mg/kg, i.p.) and were confined to the drug-paired compartment during the 4 days of conditioning. Subsequently, the animals received a dose of the vehicle or topiramate 50 mg/kg (p.o.) 60 min before the post-conditioning phase, establishing the following experimental groups: Veh Post-C,  $n = 9$ , and TPM Post-C,  $n = 10$ .

Brain extraction was performed in an additional group of animals ( $n = 8$  per group) that received the same treatment and manipulation, corresponding with the last day of the conditioning phase. Mice were sacrificed 2 h and 30 min after administration of the vehicle or TPM 50 mg/kg, and 1 h and 30 min after the last i.p. injection of cocaine 25 mg/kg. Their brains were removed from the skull and frozen over dry ice.

**Experiment 2: effect of chronic treatment with topiramate (50 mg/kg/12 h) on acquisition of the CPP induced by cocaine (25 mg/kg)** The animals ( $n = 24$ ) began chronic treatment of topiramate 50 mg/kg or the vehicle p.o. on PND 55, 15 days before conditioning with cocaine 25 mg/kg and during 8 days that the conditioning lasted, in a schedule of two daily administrations separated by an interval of 12 h, 7 days a week for a total period of 23 days (a total of 46 doses). Administration took place in a lit room. Conditioning also took place during this period of chronic treatment, and both finalized on the same day (PND 77). The daily doses of topiramate were



not contingent to the drug-paired compartment, as they were administered in a different room. The mice acquired CPP induced by 25 mg/kg cocaine on PND 73, 74, 75, and 76. The following experimental groups were established: chronic Veh + C25,  $n = 12$ ; chronic TPM + C25,  $n = 12$ .

**Experiment 3: effect of chronic topiramate treatment (50 mg/kg/12 h) on extinction of the CPP induced by cocaine (25 mg/kg)** Mice ( $n = 27$ ) acquired CPP induced by 25 mg/kg cocaine on PND 54, 55, 56, and 57. When the extinction phase initiated (PND 63), chronic treatment of topiramate (TPM 50 mg/kg/dose p.o.) or the vehicle was administered to animals following the same procedure as that used in experiment 2. Once extinction had been confirmed in the control group after 23 days of treatment (46 total doses), the experiment terminated. The following experimental groups were established: C25 + Ext Veh,  $n = 13$ ; C25 + Ext TPM,  $n = 14$ .

#### Statistical analyses

In experiment 1, the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning was analyzed by means of a mixed analysis of variance (ANOVA) with one between variable—treatment, with six levels (Veh + Sal, Veh + C1, Veh + C25, TPM50 + Sal, TPM50 + C1, and TPM50 + C25)—and a within variable—days, with two levels (Pre-C and Post-C). Preference is considered to be extinguished when the time spent by a group in the drug-paired compartment is equal to that of the Pre-C test (analyzed using a Student's *t* test). The number of sessions required for the preference to be extinguished in each animal was analyzed by means of the Kaplan–Meier test, with Breslow (generalized Wilcoxon) comparisons when appropriate. Although the mean of the group as a whole determined the day on which extinction was achieved, preference was considered to be extinguished when a mouse spent 380 s or less in the drug-paired compartment on two consecutive days. We chose this time based on the values of all the Pre-C tests performed in the study (mean = 370 s). When the preference was not extinguished in an animal, it was assigned the number of days required for the group extinction as a whole. Two-way ANOVA (Drug—saline and cocaine—and treatment—vehicle and topiramate) followed by the Student's–Newman–Keuls method was used to analyze TH and DAT gene expression in the VTA.

In experiment 2, an ANOVA was performed in order to compare pre- and post-measures with one between variable—groups, with two levels (chronic Veh + C25 and chronic TPM50 + C25)—and a within variable—days, with two levels (Pre-C and Post-C). Differences between the time spent by mice in the drug-paired compartment in extinction or reinstatement tests after priming doses were analyzed by means of an unpaired Student's "*t*" test (experiments 1 and 2).

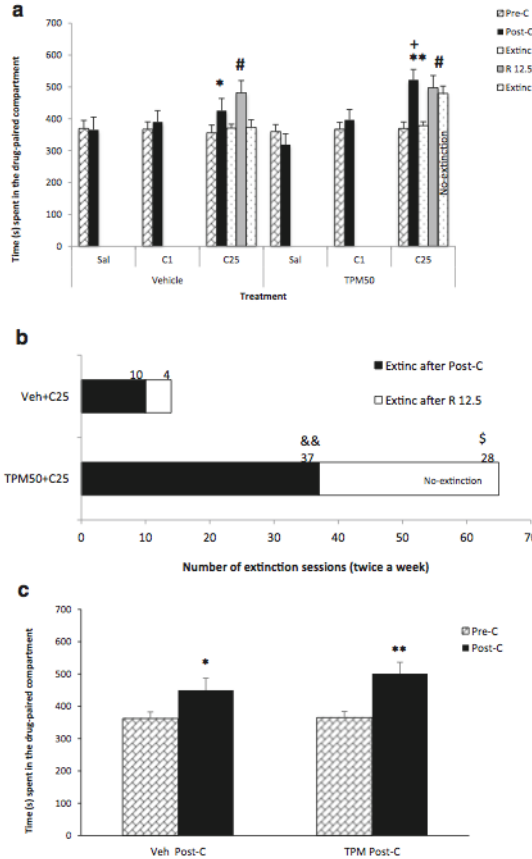
In experiment 3, the time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning was analyzed by an ANOVA with one between variable—groups, with two levels (C25 + Ext Veh and C25 + Ext TPM50)—and a within variable—days, with three levels (Pre-C, Post-C, and End). One-way ANOVA was carried out to guarantee that the Post-C scores of both groups did not differ from the outset. A Bonferroni correction was used for post hoc comparisons. All analyses were conducted using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 for Windows (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

#### Results

**Experiment 1: effect of topiramate (50 mg/kg) on acquisition and expression of CPP induced by different doses of cocaine** The results of the topiramate's effect on acquisition of CPP are presented in Fig. 2a. The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during Pre-C and Post-C revealed a significant effect of the variable days [ $F(1.56) = 8.894$ ;  $p < 0.004$ ] and the interaction days  $\times$  treatments [ $F(5.56) = 5.086$ ;  $p < 0.001$ ]. Only the Veh + C25 ( $p < 0.04$ ) and TPM50 + C25 ( $p < 0.0001$ ) group spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than in Pre-C. These results indicate that only the groups that received cocaine 25 mg/kg plus topiramate or vehicle acquired CPP. In animals conditioned with TPM50 + C25, the Post-C score was higher than that of the group conditioned with Veh + C25 ( $p < 0.031$ ). No differences between the groups were observed with respect to Pre-C scores.

The times required for preference to be extinguished after conditioning and after each of the cocaine-priming doses are presented in Fig. 2b. Kaplan–Meier analysis of the data recorded for each mouse in each group following the Post-C test (see Fig. 2c) revealed that more sessions were required to achieve extinction after Post-C in the TPM50 + C25 group than in the Veh + C25 group ( $\chi^2 = 6342$ ;  $p < 0.012$ ). Preference was reinstated with a priming dose of 12.5 mg/kg of cocaine in the Veh + C25 [ $t(8) = -2.708$ ;  $p < 0.027$ ] and TPM50 + C25 [ $t(9) = -2.685$ ;  $p < 0.031$ ] groups. Preference was extinguished in the Veh + C25 group; however, in the TPM50 + C25 group, in which CPP was reinstated with 12.5 mg/kg of cocaine, CPP was not extinguished at the end of the experiment. Kaplan–Meier analysis of the data obtained with 12.5 mg/kg of cocaine for each mouse in each group following the reinstatement test (see Fig. 2c) revealed that more sessions were required to achieve extinction after reinstatement in the TPM50 + C25 group than in the Veh + C25 group ( $\chi^2 = 4689$ ;  $p < 0.03$ ).

The results of the topiramate's effect on expression of CPP are presented in Fig. 2c. The ANOVA for the time spent in the drug-paired compartment during Pre-C and Post-C revealed a



**Fig. 2** Effects of topiramate (50 mg/kg) on acquisition and expression of cocaine-induced CPP. **a** Bars represent the mean ( $\pm$ SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (diagonal lines), after conditioning sessions (black), and in the drug-paired compartment in the last extinction session (spot printed) and in the drug-paired compartment in the cocaine reinstatement test (gray). The mice received a dose of the vehicle or topiramate (p.o.) 60 min before injection of cocaine (0, 1 or 25 mg/kg, i.p.). The doses used for priming in the Veh + Coc25 group was 12.5 mg/kg of cocaine. The doses used for priming in the TPM50 + C25 group were TPM 50 mg/kg and cocaine 12.5 mg/kg; extinction did not occur in the latter group. \*\* $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C,  $p < 0.05$  Pre-C vs. Post-C,  $p < 0.05$  Extc vs. Reinst, +  $p < 0.05$  Post-C Veh + C25 vs. Post-C TPM50 + C25. **b** Bars represent the number of sessions required for the preference induced

by 25 mg/kg of cocaine to be extinguished after the Post-C test (dark gray), or for the preference to be reinstated by 12.5 mg/kg (light gray). Values represent the number of days needed for the whole group to achieve extinction. Preference was considered to be extinguished when the time spent by a group in the drug-paired compartment was equal to that of the Pre-C test. Kaplan-Meier test:  $^{6,8}p < 0.01$  Extinc. after Post-C TPM50 + C25 vs. Extinc. after Post-C Veh + C25,  $^7p < 0.05$  Extinc. after R 12.5 TPM50 + C25 vs. Extinc. after R 12.5 Veh + C25. **c** Bars represent the mean ( $\pm$ SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (diagonal lines), and after conditioning sessions (black) in the CPP induced by 25 mg/kg of cocaine. The mice received a dose of the vehicle or topiramate (p.o.) 60 min before the post-conditioning session. \*\* $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C,  $p < 0.05$  Pre-C vs. Post-C

significant effect of the variable days [ $F(1.17) = 16.250$ ;  $p < 0.001$ ], but not the interaction days  $\times$  treatments [ $F(1.17) = 0.779$ ; n.s.], as a significant increase in the time spent in the drug-paired compartment in Post-C was observed in two groups (that receiving vehicle and that receiving TPM before the Post-C test), thus showing a conditioned preference induced by cocaine (25 mg/kg) [vehicle group:  $F(1.17) = 4.709$ ;  $p < 0.04$ ; TPM group:  $F(1.17) = 12.743$ ;  $p < 0.002$ ].

**Tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT) gene expression analyses in the VTA**

Real-time PCR experiments revealed that COC produced a significant decrease of TH gene expression in the VTA of VEH-treated mice compared to those receiving SAL. Interestingly, this effect was significantly higher when mice administered with SAL or COC during place conditioning sessions were treated with TPM (Fig 3a; two-way ANOVA followed by the Student's–Newman–Keuls method, drug:  $F(1.31) = 0.235$ ,  $p < 0.631$ , treatment:  $F(1.31) = 33.513$ ,  $p < 0.001$ , and drug  $\times$  treatment:  $F(1.31) = 7.402$ ,  $p < 0.010$ ). On the other hand, DAT gene expression in the VTA was significantly reduced by COC in VEH-treated mice. TPM treatment in mice that received SAL or COC during conditioned place preference induced a significant diminishing of DAT mRNA levels (Fig. 3b, drug:  $F(1.31) = 46.855$ ,  $p < 0.001$ , treatment:  $F(1.31) = 2.001$ ,  $p < 0.170$ , and drug  $\times$  treatment:  $F(1.31) = 3.524$ ,  $p < 0.073$ ).

**Experiment 2: effect of chronic treatment with topiramate (50 mg/kg/12 h) on acquisition of CPP induced by cocaine (25 mg/kg)** The results of chronic topiramate treatment on acquisition of CPP induced by cocaine are presented in Fig. 4a. The ANOVA revealed a significant effect of the variable days [ $F(1.22) = 33.474$ ;  $p < 0.0001$ ]—as more time was spent in the drug-paired compartment in the Post-C tests than in the Pre-C phase ( $p < 0.0001$ )—and of the interaction days  $\times$  treatments [ $F(1.22) = 5.899$ ;  $p < 0.024$ ]. Although both groups

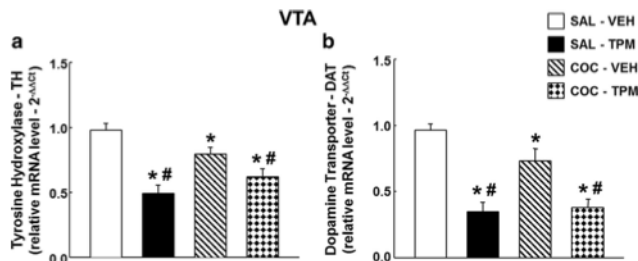
spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than in Pre-C (chronic Veh + C25,  $p < 0.027$ ; and chronic TPM + C25,  $p < 0.0001$ ), the score of Post-C of the chronic TPM + C25 group was higher than that of the chronic Veh + C25 group ( $p < 0.037$ ). No differences between the groups were observed in Pre-C scores. The evolution of the extinction process in these groups is represented in Fig.4b. Preference was reinstated in the chronic Veh + C25 [ $t(9) = -2.806$ ;  $p < 0.021$ ] and chronic TPM + C25 [ $t(10) = -2.198$ ;  $p < 0.05$ ] groups after a priming dose of cocaine 12.5 mg/kg. The group chronic TPM + C25 reinstated with a priming dose of 6.25 mg/kg of cocaine [ $t(10) = -3.013$ ;  $p < 0.013$ ], while the other group did not.

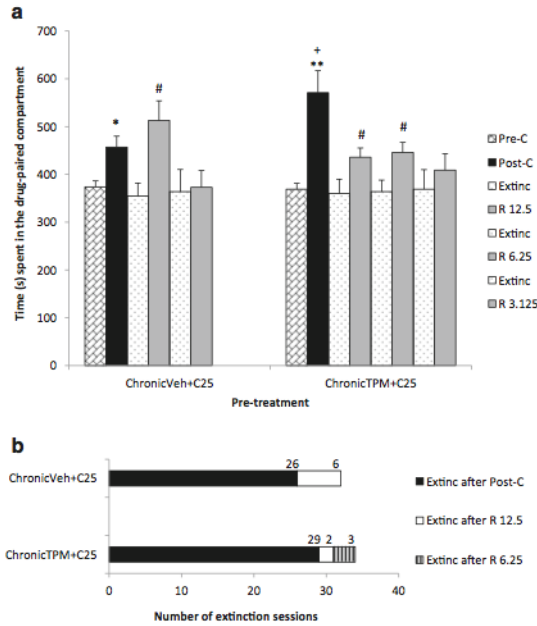
**Experiment 3: effect of topiramate chronic treatment (50 mg/kg/12 h) on extinction of the CPP induced by cocaine (25 mg/kg)** The results of topiramate treatment (50 mg/kg/12 h) on extinction of CPP induced by cocaine are presented in Fig. 5. The ANOVA showed a significant effect of days [ $F(2.50) = 9.86$ ;  $p < 0.0001$ ] and the interaction treatment  $\times$  days [ $F(2.50) = 3.821$ ;  $p < 0.029$ ], indicating that all the animals spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than in Pre-C (C25 + Ext Veh,  $p < 0.005$ , and C25 + Ext TPM,  $p < 0.0001$ ). Additionally, C25 + Ext TPM mice spent more time in the drug-paired compartment in Post-C than the C25 + Ext Veh group ( $p < 0.036$ ) until the end of treatment. While the C25 + Ext TPM group continued to show no differences ( $p < 0.049$ ), CPP was extinguished in the C25 + Ext Veh group, and therefore the experiment was terminated. No differences were observed between groups in the Pre-C phase.

**Discussion**

The present study provides further evidence against the use of topiramate for the treatment of problems related to cocaine dependence. This assumption is supported by the following results: (1) topiramate significantly increased cocaine-induced CPP (25 mg/kg) and delayed or blocked extinction in all

**Fig. 3** Relative TH and DAT gene expression in the VTA of mice from experiment 1 (a and b, respectively). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$  animals per group). \*  $p < 0.05$ , vs SAL-VEH group. #  $p < 0.05$ , vs COC-VEH group (Student's–Newman–Keuls method)





**Fig. 4** Effect of chronic treatment with topiramate (50 mg/kg/12 h) on acquisition of the CPP induced by cocaine (25 mg/kg). The animals began chronic treatment with topiramate 50 mg/kg or vehicle p.o. on PND 55 with a schedule of two daily administrations separated by an interval of 12 h 7 days a week, with a total length of 23 days (15 days before conditioning with cocaine 25 mg/kg and 8 days during conditioning; total of 46 doses). Administration was carried out in a lit room. **a** Bars represent the mean ( $\pm$ SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (diagonal lines), after conditioning sessions (black), mean time spent in the drug-paired compartment in the last extinction session (spot printed) and mean time spent in the drug-paired compartment in the cocaine reinstatement test (gray). The

doses of cocaine used for priming in the chronic Veh + C25 group were 12.5 and 6.25 mg/kg. The doses of cocaine used for priming in the chronic TPM + C25 group were 12.5, 6.25 and 3.125 mg/kg. \* $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C, # $p < 0.05$  Pre-C vs. Post-C,  $p < 0.05$  Extc vs. Reinst.,  $p < 0.05$  Post-C chronic Veh + C25 vs. Post-C chronic TPM + C25. **b** Bars represent the number of sessions required for the preference induced by 25 mg/kg of cocaine to be extinguished after the Post-C test (black), or for the preference to be reinstated by 12.5 (white) or 6.25 mg/kg (vertical lines). Values represent number of days needed for the whole group to achieve extinction. Preference was considered to be extinguished when the time spent by a group in the drug-paired compartment was equal to that of the Pre-C test

patterns of administration analyzed (conditioning, pre-conditioning, and extinction phases); and (2) topiramate induced alterations of key targets (TH and DAT in the VTA) closely related with the rewarding effects of cocaine.

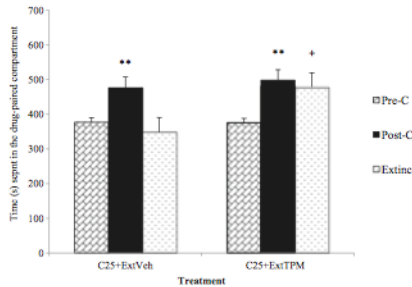
Current treatment of cocaine use disorders is based on pharmacological and psychotherapeutic approaches, but the clinical outcome of these interventions is poor, with a significant proportion of patients resuming cocaine consumption within 1 year. In this context, no specific effective pharmacological treatment currently exists for cocaine dependence. In recent years, topiramate has emerged as a potential new drug for the treatment of cocaine dependence. However,

controversial pre-clinical (Echeverry-Alzate et al. 2014; Gasior et al. 1999; Le Foll et al. 2008) and clinical results (Johnson et al. 2013b; Kampman et al. 2004; Reis et al. 2008) call into question its efficacy.

In this study, the effects of topiramate on the rewarding properties of cocaine were analyzed in the CPP using three experimental approaches. Topiramate was administered (1) during cocaine (0, 1, 25 mg/kg, i.p.) conditioning sessions (4 days) and post-conditioning session of CPP induced by cocaine (25 mg/kg); (2) 2 weeks prior to, and during cocaine conditioning (25 mg/kg); and (3) during the extinction of CPP induced by cocaine (25 mg/kg). In the first experiment,



## Psychopharmacology



**Fig. 5** Effect of topiramate treatment (50 mg/kg/12 h) on extinction of the CPP induced by cocaine (25 mg/kg). When CPP finalized the extinction phase initiated (63 PND) and animals began treatment with topiramate (TPM 50 mg/kg p.o.) or vehicle with a two daily administration schedule separated by an interval of 12 h for 7 days a week with a total length of 23 days (total of 46 doses). Administration was carried out in a lit room. Once CPP had been extinguished in the control group, after 23 days of treatment (46 doses), the experiment was terminated. *Bars* represent the mean ( $\pm$ SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (*diagonal lines*), after conditioning sessions (*black*), and in the last extinction session (*spot printed*). \* $p < 0.001$  Pre-C vs. Post-C, \* $p < 0.05$  End TPM treatment vs. End Veh treatment

topiramate administration significantly increased the CPP induced by cocaine 25 mg/kg and blocked extinction with respect to the animals treated only with cocaine. These results suggest that topiramate significantly increases the rewarding properties of cocaine, and fails to reduce its expression in the CPP. In line with these findings, previous data have demonstrated that topiramate fails to reduce the response to cocaine (Echeverry-Alzate et al. 2014; Le Foll et al. 2008) and does not prevent cocaine-induced clonic seizures (Gasiior et al. 1999) in rodents. However, none of the groups conditioned with the subthreshold dose of cocaine (1 mg/kg)—with or without contingent topiramate administration—presented CPP. Thus, we can affirm that topiramate did not increase the rewarding effects of a subthreshold dose of cocaine. Previous studies in our laboratory have demonstrated that this dose is ineffective in inducing CPP in naive mice (Maldonado et al. 2006; Vidal-Infer et al. 2012; Arenas et al. 2014; Montagud-Romero et al. 2014; Mateos-García et al. 2015; Rodríguez-Arias et al. 2015). Furthermore, according to another study in which no conditioned rewarding or aversive effects of topiramate were observed in mice in the CPP procedure (Tatsuta et al. 2007), topiramate has no motivational properties itself when administered alone.

In order to further analyze the mechanism underlying the effects of topiramate on cocaine-induced CPP, alterations in the expression of the TH and DAT genes, key targets closely related to the reward system, were studied in the VTA. Results showed that cocaine significantly reduced the expression of

both genes in the VTA. Previous studies have reported that acute administration of cocaine increases TH and DAT gene expression in different brain areas, including the VTA and NAc (Balda et al. 2009; Belin et al. 2007; Darland et al. 2012). These discrepancies may be due to the type of cocaine administration applied (acute vs chronic), the doses of cocaine administered, and the strain of animal used (rats, mice, and zebrafish). Interestingly, administration of topiramate produced a significantly higher reduction of the TH and DAT gene expression induced by cocaine, an effect that was not dependent on cocaine administration, since a similar decrease was obtained in TPM plus saline- and TPM plus cocaine-treated animals. This effect, mediated by TPM, was associated with a significant increase in place conditioning induced by an effective dose of cocaine, without having any effect in TPM plus saline-treated mice. Therefore, further studies are necessary to clarify the exact mechanism underlying the effects of TPM. It is tempting to hypothesize that these alterations are induced by indirect mechanisms (modulation of GABA and/or glutamate receptors), as no previous studies have reported direct interaction with the dopamine reward system (Braga et al. 2009; Johnson 2005).

According to previous studies, the pattern of administration of topiramate can lead to different results. In this way, acute topiramate administration reduces some aspects of motor impulsivity, such as anxiety, novelty-seeking or impatience, whereas chronic topiramate dosage reduces some aspects of cognitive impulsivity, such as delayed aversion (Navarrete et al. 2012b). On the other hand, acute administration of topiramate (1–5 days) was shown to significantly reduce ethanol-reinforcing effects in an oral ethanol self-administration paradigm, while the effect disappeared with additional doses (6–10 days) (Moore et al. 2014). Therefore, the second experiment aimed to evaluate if chronic dosage of topiramate (23 days, twice a day) produced different results to those obtained when topiramate was only administered prior to conditioning sessions. As shown in Fig. 4, the effect of topiramate was similar to that observed in the previous experimental design, with an enhancement of cocaine-induced CPP and a delay of extinction. Mice pre-treated with topiramate were more sensitive to a lower priming dose of cocaine after extinction was achieved (last reinstatement with the dose of 6.25 mg/kg), compared with those pre-treated with saline (last reinstatement with 12.5 mg/kg). These data suggest that topiramate not only enhances the rewarding effects of cocaine, but also sensitizes the reward system and increases priming-induced reinstatement.

Interestingly, in the third experiment, administration of topiramate after the post-conditioning session completely blocked the extinction of cocaine-induced place conditioning, unlike in saline-treated mice. These effects may have been due to blockade of the extinction processes, or an increase in the reinforcing actions of contextual cues associated with cocaine

administration. Previous studies have shown that topiramate enhances the euphoria and stimulating effects associated with cocaine (Kampman et al. 2013) and the rewarding effects of nicotine (Reid et al. 2007), and accentuates the euphoria and stimulation induced by methamphetamines (Johnson et al. 2007), effects that could be closely associated with failure to maintain abstinence and avoid relapse. Indeed, although topiramate has been shown to reduce craving in cocaine-dependent subjects, it is relevant that only a minority of these patients remained abstinent (Reis et al. 2008).

Although several studies have identified topiramate as an interesting therapeutic option for the management of cocaine dependence, some clinical evidence has highlighted some limitations (Umbrecht et al. 2014). A very recent Cochrane review of 20 clinical trials with 2068 participants, concluded that current evidence does not support the clinical use of anticonvulsant medications (e.g., topiramate) in the treatment of patients with cocaine dependence. Moreover, the authors declared that anticonvulsants as a pharmacological family cannot be considered a first-, second- or third-line treatment for cocaine dependence (Minozzi et al. 2015). Indeed, the efficacy of topiramate has been closely linked with associated regular cognitive-behavioral therapy (CBT) (Nuijten et al. 2014; Johnson et al. 2013a; Reis et al. 2008), while it may increase the euphoria and stimulant effects of low doses of cocaine (Johnson et al. 2013b). In fact, the Division of Pharmacotherapy of the University of Texas has recently recommended that topiramate not be used as a first-line treatment of cocaine-use disorder in light of the limited and discrepant clinical evidence, and that its use be limited to certain situations/populations in combination with CBT for treatment retention (Blaze 2015).

In conclusion, the results of the present study suggest that topiramate potentiates the rewarding properties of cocaine by increasing place conditioning and delaying/blocking extinction. These data are an important addition to the somewhat limited and mixed current clinical evidence and question the therapeutic usefulness of topiramate for treating cocaine dependence. Although further pre-clinical studies are warranted to clarify the interaction between topiramate and cocaine, our results, together with previous research, suggest it is highly recommendable to limit the use of topiramate in cocaine-dependent patients.

**Acknowledgments** We wish to thank to Ana Díaz PhD, responsible for the welfare of experimental animals in our university, to INVASSAT, particularly Teresa Capilla, for laboratory equipment, and Brian Normanly for his editing of the manuscript. This work was supported by the following research grants: Ministerio de Economía y Competitividad, Dirección General de Investigación, PSI2014-51847-R (José Miñarro) and SAF2011-23420 (Jorge Manzanares). Instituto de Salud Carlos III, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RECTICS), Red de Trastornos Adictivos (RTA) RD12/0028/0005 (José Miñarro), RD12/0028/0019 (Jorge Manzanares) and Fondos FEDER. Generalitat Valenciana, Conselleria de Educació, PROMETEOII/2014/063.



**Conflict of ethical standards** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2009) Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev* 59:253–277. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.08.002
- Aracil-Fernández A, Almela P, Manzanares J (2013) Pregabalin and topiramate regulate behavioural and brain gene transcription changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *Addict Biol* 18:252–262. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00406.x
- Arenas MC, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2014) Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Physiol Behav* 133:152–160. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.028
- Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2009) The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett* 457:120–124
- Belin D, Deroche-Gamonet V, Jaber M (2007) Cocaine-induced sensitization is associated with altered dynamics of transcriptional responses of the dopamine transporter, tyrosine hydroxylase, and dopamine D2 receptors in C57Bl/6 J mice. *Psychopharmacology* 193: 567–578
- Blaze MP (2015) Topiramate in Stimulant Use Disorder: Is Topiramate All it's Cracked Up to Be? Review. Division of Pharmacotherapy, The University of Texas. <https://www.utexas.edu/pharmacy/divisions/pharmacology/rounds/blaze04-09-15.pdf>
- Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Li H, Rogawski MA (2009) Topiramate reduces excitability in the basolateral amygdala by selectively inhibiting GluK1 (GluR5) kainate receptors on interneurons and positively modulating GABA<sub>A</sub> receptors on principal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 330:558–566
- Darland T, Mauch JT, Meier EM, Hagan SJ, Dowling JE, Darland DC (2012) Sulpiride, but not SCH23390, modifies cocaine-induced conditioned place preference and expression of tyrosine hydroxylase and elongation factor 1alpha in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 103:157–167
- Echeverry-Alzate V, Giné E, Bühler KM, Calleja-Conde J, Olmos P, Gorriti MA, et al. (2014) Effects of topiramate on ethanol-cocaine interactions and DNA methyltransferase gene expression in the rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* 171:3023–3036. doi:10.1111/bph.12636
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2007) EMCDDA Literature reviews — Treatment of problem cocaine use: a review of the literature. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. ISBN: 92-9168-274-8.

- Gasior M, Ungard JT, Witkin JM (1999) Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1148–1156
- Gass JT, Olive MF (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75:218–265
- Johnson BA (2004) Topiramate-induced neuromodulation of cortico-mesolimbic dopamine function: a new vista for the treatment of comorbid alcohol and nicotine dependence? *Addict Behav* 29:1465–1479. doi:10.1016/j.addbeh.2004.06.014
- 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* 19:873–896. doi:10.2165/00023210-200519100-00005
- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Wells LT, Wallace CL, Dawes MA, et al. (2007) Effects of acute topiramate dosing on methamphetamine-induced subjective mood. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:85–98
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Wang XQ, Penberthy JK, Javors MA, Seneviratne C, et al. (2013a) Topiramate for the treatment of cocaine addiction: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry* 70:1338–1346. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.2295
- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Gunderson EW, Haughey HM, Wang XQ, et al. (2013b) Topiramate's effects on cocaine-induced subjective mood, craving and preference for money over drug taking. *Addict Biol* 18:405–416. doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00499.x
- Kampman KM, Patinas H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, et al. (2004) A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 75:233–240
- Kampman KM, Pettinati HM, Lynch KG, Spratt K, Wierzbicki MR, O'Brien CP (2013) A double-blind, placebo-controlled trial of topiramate for the treatment of comorbid cocaine and alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 133:94–99. doi:10.1016/j.drugaldep.2013.05.026
- Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, et al. (2008) New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:425–438
- Kim JH, Lawrence AJ (2014) Drugs currently in Phase II clinical trials for cocaine addiction. *Expert Opin Investig Drugs* 23:1105–1122. doi:10.1517/13543784.2014.915312
- Le Foll B, Justinova Z, Wertheim CE, Barnes C, Goldberg SR (2008) Topiramate does not alter nicotine or cocaine discrimination in rats. *Behav Pharmacol* 19:13–20. doi:10.1097/FBP.0b013e3282f3cf84
- Lin SK (2013) Pharmacological means of reducing human drug dependence: a selective and narrative review of the clinical literature. *Br J Clin Pharmacol* 77:242–252. doi:10.1111/bcp.12163
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 25:402–408
- Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J (2006) Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behav Pharmacol* 17:119–131
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001) Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 121:189–197
- Manzanedo C, García-Pardo MP, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA (2012) Pre-treatment with high doses of cocaine decreases the reinforcing effects of cocaine in the conditioned place preference paradigm. *Neurosci Lett* 516:29–33. doi:10.1016/j.neulet.2012.03.044
- Mateos-García A, Roger-Sánchez C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Manzanedo C, et al. (2015) Higher sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine and MDMA in High-Novelty-Seekers mice exposed to a cocaine binge during adolescence. *Psychopharmacology* 232:101–113. doi:10.1007/s00213-014-3642-y
- Minozzi S, Cinquini M, Amato L, Davoli M, Farrell MF, Pani PP, et al. (2015) Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev* 17(4):CD006754. doi:10.1002/14651858.CD006754.pub4
- Montagud-Romero S, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J (2014) The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of intermittent ethanol administration during adolescence. *PLoS One* 9:e92576. doi:10.1371/journal.pone.0092576 eCollection 2014
- Moore CF, Lycas MD, Bond CW, Johnson BA, Lynch WJ (2014) Acute and chronic administration of a low-dose combination of topiramate and ondansetron reduces ethanol's reinforcing effects in male alcohol preferring (P) rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 22:35–42. doi:10.1037/a0035215
- Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Manzanedo J (2012a) Pregabalin- and topiramate-mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol* 167:183–195. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01981.x
- Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Manzanedo J (2012b) Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor-mediated regulation of impulsive-like behaviour in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol* 165:260–273. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01542.x
- Nuijten M, Blanken P, van den Brink W, Hendriks V (2014) Treatment of crack-cocaine dependence with topiramate: a randomized controlled feasibility trial in The Netherlands. *Drug Alcohol Depend* 138:177–184. doi:10.1016/j.drugaldep.2014.02.024
- Reid MS, Palamar J, Raghavan S, Flaminio F (2007) Effects of topiramate on cue-induced cigarette craving and the response to a smoked cigarette in briefly abstinent smokers. *Psychopharmacology* 192:147–158
- Reis AD, Castro LA, Faria R, Laranjeira R (2008) Craving decrease with topiramate in outpatient treatment for cocaine dependence: an open label trial. *Rev Bras Psiquiatr* 30:132–135
- Rodríguez-Arias M, Montagud-Romero S, Rubio-Araiz A, Aguilar MA, Martín-García E, Cabrera R, Maldonado R, Porcu F, Colado MI, Miñarro J (2015) Effects of repeated social defeat on adolescent mice on cocaine-induced CPP and self-administration in adulthood: integrity of the blood-brain barrier. *Addict Biol*. doi:10.1111/adb.12301
- Tatsuta T, Kitanaka N, Kitanaka J, Morita Y, Takemura M (2007) Lack of effect of anticonvulsant topiramate on methamphetamine-induced stereotypy and rewarding property in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 87:48–55. doi:10.1016/j.pbb.2007.03.019
- Tschenkentz TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12:227–462
- Umbrecht A, DeFulio A, Winstanley EL, Tompkins DA, Peirce J, Mintzer MZ, et al. (2014) Topiramate for cocaine dependence during methadone maintenance treatment: a randomized controlled trial. *Drug Alcohol Depend* 140:92–100. doi:10.1016/j.drugaldep.2014.03.033
- United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report (2014) United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7. [http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2014/World\\_Drug\\_Report\\_2014\\_web.pdf](http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf)
- Vidal-Infer A, Arenas MC, Daza-Losada M, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2012) High novelty-seeking predicts greater sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 102:124–132. doi:10.1016/j.pbb.2012.03.031



## 9. Discusi3n general



El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido comprobar las consecuencias que a largo plazo pueden tener diversos factores de vulnerabilidad durante la adolescencia, sobre la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína y otras drogas, y sobre su nivel de consumo en sujetos adultos. Principalmente, nuestros resultados muestran que un consumo temprano de drogas, como la cocaína y el alcohol, realizado durante un periodo de desarrollo cerebral como es la adolescencia, diferentes consecuencias a largo plazo, dependiendo de ciertos factores como son el rasgo de personalidad búsqueda de la novedad o el sexo de pertenencia del sujeto.

En el presente trabajo, los animales que son pre-tratados con cocaína en un patrón de consumo tipo *binge* durante la adolescencia, presentan en la edad adulta un aumento en la sensibilidad al refuerzo condicionado de drogas, como son la cocaína y la MDMA, de modo similar a lo observado en estudios anteriores (Daza-Losada y cols., 2009). De igual manera, una exposición intensiva e intermitente de etanol durante la adolescencia, siguiendo el patrón de *binge drinking*, también produce un aumento de la sensibilidad a los efectos condicionados de la cocaína en el CPL, corroborando resultados ya descritos en la literatura (Hutchison y Riley, 2012; Molet y cols., 2013; Montagud-Romero y cols., 2014). Esta exposición temprana de alcohol también provoca que los ratones presenten un mayor consumo de cocaína durante la etapa adulta, utilizando el paradigma de AA. Estos

## ***Discusión general***

resultados coinciden con los descritos en una reciente revisión sobre las consecuencias del consumo de drogas en la adolescencia (Spear, 2016). Se ha observado que cuando los animales adolescentes se exponen al consumo de drogas como el etanol o los cannabinoides, incrementan la autoadministración de etanol o de otras drogas como la cocaína cuando son evaluados en la adultez (Ellgren y cols., 2007; Biscaia y cols., 2008; Higuera-Matas y cols., 2008; Alaux-Cantin y cols., 2013; Boutros y cols., 2014; Pandey y cols., 2015). Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral, pudimos comprobar de manera novedosa que el efecto a largo plazo de la exposición a la cocaína, solo se produce cuando el *binge* es administrado en la adolescencia, no observándose dichos efectos a largo plazo, si el *binge* se realiza en la edad adulta. Este dato nos confirma la importancia de la etapa ontogénica donde se efectúa el consumo, ya que un *binge* de cocaína, por sí mismo, no es suficiente para desarrollar una vulnerabilidad a los efectos reforzantes de las drogas a largo plazo, sino que debe ser realizado en la adolescencia. Se ha demostrado que la exposición al etanol durante la adolescencia produce alteraciones a largo plazo en el sistema nervioso central, como la inducción de neuroinflamación (Pascual y cols., 2007; Vetreno y Crews, 2012; Pascual y cols., 2014), la reducción de la neurogénesis o la muerte celular en zonas como la CPF, el hipocampo o el cerebelo (Crews y cols., 2000; Nixon y cols., 2010; Ehlers y cols., 2013; Broadwater y cols., 2014; Vetreno y Crews, 2015). Sin embargo, dichos cambios en la neurogénesis y muerte celular no



se observan si la exposición al etanol se realiza durante la adultez (Broadwater y cols., 2014). Estos resultados podrían ayudar a explicar por qué el *binge* de cocaína solo tiene efectos a largo plazo, sobre las propiedades reforzantes de las drogas, si es efectuado durante la adolescencia. La literatura disponible nos indica que la adolescencia es el momento de la vida donde más frecuentemente se inicia el contacto con las drogas (Casey y Jones, 2010; Spear, 2011). Además, sabemos que los roedores adolescentes son más sensibles a los efectos reforzantes de las sustancias de abuso y menos a los efectos aversivos, en comparación con los animales adultos (Schramm-Sapyta y cols., 2009). Todo ello puede producir que, una vez iniciado el contacto con la droga, los adolescentes mantengan con mayor probabilidad su consumo. Como este periodo se considera crítico en el desarrollo cerebral, debido a los cambios de plasticidad característicos de esta etapa vital (Spear, 2013), los efectos de las drogas administradas durante este periodo serán más duraderos. Nuestros resultados confirman, por tanto, que la adolescencia es una etapa crítica en cuanto a las consecuencias a largo plazo que una exposición puntual, pero intensiva, a drogas como el alcohol y la cocaína, pueden tener sobre la vulnerabilidad para desarrollar un consumo compulsivo de estas sustancias en el sujeto adulto.

Por otro lado, también hemos observado que el rasgo de búsqueda de la novedad puede explicar, en parte, las diferencias individuales

## ***Discusión general***

existentes ante el posible desarrollo de un trastorno por uso de sustancias, tras un contacto con las drogas. Como se sabe, la preferencia por la novedad puede ser un factor relevante a la hora de predecir el uso de sustancias de abuso, tanto en humanos como en roedores (Wingo y cols., 2016; Arenas y cols., 2016). Estudios anteriores de nuestro y otros laboratorios han mostrado que los ratones altos buscadores de la novedad presentan una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína (Vidal-Infer y cols., 2012; Arenas y cols., 2014), o a los efectos reforzantes de la anfetamina (Robinet y cols., 1998; Klebaur y Bardo, 1999; Pelloux y cols., 2004) en el paradigma de CPL. De manera similar, animales altos buscadores de la novedad presentan un mayor consumo de anfetamina (Cain y cols., 2005; Meyer y cols., 2010), metilfenidato (de la Peña y cols., 2014) y cocaína (Beckmann y cols., 2011; Belin y cols., 2011; Dickson y cols., 2015) en el paradigma de AA. En nuestro trabajo sin embargo, quisimos conocer si el consumo intensivo de cocaína durante la adolescencia podía influir a largo plazo, en el desarrollo de dicha sensibilidad de manera diferente, según el nivel de búsqueda de la novedad de los animales. Nuestros resultados reflejan que solo los animales con un alto nivel de búsqueda de la novedad, expuestos durante la adolescencia a una administración intensiva de cocaína, presentan un aumento de la sensibilidad al refuerzo condicionado de la cocaína y la MDMA en la etapa adulta. Otros estudios de nuestro laboratorio confirman estos resultados, ya que también han mostrado

como animales altos buscadores de la novedad pre-tratados durante la adolescencia con etanol (Montagud-Romero y cols., 2014), o con MDMA (Rodríguez-Arias y cols., 2015) muestran un aumento en la sensibilidad al refuerzo condicionado de la cocaína y la MDMA durante la adultez. Todo ello confirma que el alto nivel de búsqueda de la novedad en los individuos supone un incremento en el riesgo ante el uso de sustancias, como indica la literatura (Arenas y cols., 2016). Esto pone de relieve que el nivel innato de preferencia por la novedad, influye en los efectos a largo plazo de un consumo intensivo de drogas durante la adolescencia.

Otro de los objetivos destacables de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar el sexo de pertenencia como posible factor de vulnerabilidad a un trastorno por uso de sustancias. Según nuestros resultados, machos y hembras no presentan de la misma manera, las consecuencias a largo plazo de un consumo intensivo de etanol durante la adolescencia. En general, las hembras muestran un mayor consumo de cocaína y una mayor progresión en la escalada de dicho consumo en la AA en comparación a los machos, de manera similar a lo observado en la literatura (Becker y Hu, 2008; Anker y Carroll, 2011; Becker y cols., 2012). Estas mismas diferencias de sexo han sido también observadas en la autoadministración de otras drogas: las hembras realizan durante los primeros días mayor ingesta de alcohol (Moore y Lynch, 2015), una mayor autoadministración de morfina

## ***Discusión general***

(Lynch y Carroll, 1999; Cicero y cols., 2003; Roth y cols., 2004) o una más rápida adquisición de la respuesta a agonistas cannabinoides según la cepa (Fattore y cols., 2007). Además, en el presente estudio, hemos puesto de relieve que el *binge* de etanol en la adolescencia intensifica estas diferencias de sexo.

Por otro lado, tanto machos como hembras pre-expuestos al etanol durante la adolescencia, presentan una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes condicionados de una dosis sub-umbral de cocaína en el paradigma de CPL cuando son evaluados en la adultez. Anteriormente, se ha descrito que las ratas hembras son más sensibles a los efectos reforzantes condicionados de la cocaína que los machos, ya que estas llegaron a adquirir el CPL con dosis más bajas (Russo y cols., 2003; Zakharova y cols., 2009); aunque no todos los estudios han mostrado estas diferencias de sexo (Bobzean y cols., 2010; Hilderbrand y Lasek, 2014). Dichos resultados, supuestamente contradictorios, pueden deberse a diferencias metodológicas. De hecho, en nuestro trabajo, aunque el *binge* de etanol sensibiliza aparentemente por igual a ambos sexos en el CPL, puesto que machos y hembras adquieren la preferencia condicionada con una dosis no efectiva, cuando esos mismos animales son evaluados posteriormente en el paradigma de la AA, se observan claramente las diferencias de sexo producidas por la exposición temprana al etanol. El empleo de los dos modelos preclínicos más utilizados para evaluar la adicción, como

son el CPL y la AA, nos ha proporcionado información complementaria de dos aspectos independientes de los efectos reforzantes de la cocaína (Tzschentke, 1998, 2007; Aguilar y cols., 2009). Por un lado, hemos observado los efectos reforzantes condicionados de la droga empleando el paradigma de CPL con una dosis subumbral, y por otro lado, la conducta instrumental de búsqueda de la droga y su consumo, gracias al paradigma de la AA (Belin-Rauscent y Belin, 2012).

Además, hemos observado que esta exposición temprana al etanol produce efectos a largo plazo diferentes dependiendo del sexo sobre la respuesta motora a la cocaína. Se ha observado un efecto sensibilizador en las hembras, las cuales aumentan su reactividad motora, en especial con una dosis subumbral; mientras que los machos presentan un efecto de tolerancia, reduciendo su hiperactividad ante una dosis elevada de cocaína. Estudios previos ya habían informado de una mayor reactividad motora en hembras frente a una administración aguda o crónica de cocaína en comparación a los machos (Van Haaren y Meyer, 1991; Sell y cols., 2000; Walker y cols., 2001; Chin y cols., 2002; Festa y cols., 2004). Incluso, ya se había informado de un descenso de la hiperactividad motora inducida por la cocaína en machos pre-expuestos al etanol durante la adolescencia (Hutchinson y cols., 2010); sin embargo, es la primera vez que se describen las consecuencias de esta temprana

## ***Discusión general***

exposición al etanol sobre los efectos motores de la cocaína en hembras.

En base a todo ello, nuestros resultados demuestran que la pertenencia al sexo femenino es un factor de vulnerabilidad a tener en cuenta, ante las consecuencias que una exposición temprana a las drogas pueden tener sobre el desarrollo de un trastorno por uso de sustancias.

Un segundo objetivo de la presente Tesis Doctoral, ha sido evaluar la eficacia del topiramato como posible candidato en el tratamiento de la dependencia a la cocaína. Nuestros resultados indican que, lejos de bloquear o reducir la adquisición del CPL inducido por una dosis efectiva de cocaína, el topiramato incrementa los efectos reforzantes condicionados de la droga, y prolonga la conducta de búsqueda de la misma. Esta incapacidad para reducir el refuerzo condicionado que induce la cocaína, también se ha observado tras un tratamiento crónico del fármaco, tanto previo como posterior a la adquisición del condicionamiento. Lo que nos indica que ni el tratamiento agudo ni el crónico con topiramato parecen resultar eficaces como terapia farmacológica de la adicción a la cocaína. Estudios previos preclínicos ya habían descrito que el topiramato no conseguía bloquear o reducir algunos efectos de la respuesta a la cocaína (Le Foll y cols., 2008) y al alcohol (Navarrete y cols., 2013, Echeverry-Alzate, 2014). Sin embargo,

este es el primer estudio que demuestra la ineficacia del topiramato para bloquear los efectos reforzantes condicionados de la cocaína en el CPL, resultado similar al observado en un estudio anterior donde el topiramato no bloqueó el CPL inducido por metanfetamina (Tatsuta y cols., 2007).

La evaluación bioquímica realizada en este estudio, apoya los resultados conductuales obtenidos. Hemos observado una reducción de la expresión génica de la TH y la DAT en el ATV en ratones tratados con cocaína. En otros estudios, por el contrario, se ha observado un aumento de la expresión génica de la TH y de la DAT tanto en el ATV como en el NAcc pero tras la administración aguda de cocaína (Belin y cols., 2007; Balda y cols., 2009; Darland y cols., 2012). Hay que considerar que en nuestro estudio se realizó una administración semicrónica (4 días de tratamiento), por lo que dichas diferencias metodológicas pueden estar influyendo en la discrepancia de los resultados con la literatura. Esta reducción en los marcadores evaluados es mayor con la administración del topiramato, ya sea solo o en interacción con la cocaína, por lo que este mayor efecto parece deberse únicamente al topiramato. Por tanto, el topiramato parece potenciar la alteración bioquímica provocada por la cocaína a nivel dopaminérgico, ya que produce alteraciones por sí mismo incluso en ausencia de la droga. La reducción que hemos encontrado en el DAT, encargado de realizar la recaptación de la DA en el espacio sináptico

## ***Discusión general***

(McHugh y Buckley, 2015), podría estar propiciando un aumento de la disponibilidad dopaminérgica. Al mismo tiempo, la disminución de la TH, enzima esencial en la síntesis de la DA (Tekin y cols., 2014), podría ser un reflejo compensatorio de la alteración en la actividad dopaminérgica a nivel del ATV. Estos resultados nos hacen considerar que son necesarios más estudios para clarificar el mecanismo de actuación del topiramato. A pesar de ello, nos permiten afirmar que el topiramato sí influye a nivel dopaminérgico, y que esa influencia podría estar propiciando, aunque de forma indirecta, la potenciación del efecto reforzante condicionado de la cocaína que hemos observado con la administración de este anticonvulsivante.

Recientes revisiones de estudios en humanos que evalúan la utilidad del topiramato en el tratamiento de la adicción a la cocaína (Minozzi y cols., 2015; Singh y cols., 2016), limitan la eficacia de dicho fármaco. Por ello, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral desde la investigación pre-clínica resultan tan interesantes, ya que afianzan la poca eficacia del topiramato como herramienta terapéutica.

En general, la presente Tesis Doctoral demuestra como la experiencia temprana con drogas de abuso provoca consecuencias a largo plazo. Además, también muestra como estos cambios pueden ser modulados por diferentes factores como son la edad, el sexo y variables de personalidad. Consideramos que sus resultados, vistos en su conjunto,



nos ayudan a comprender mejor las diferencias observadas en la población general ante su respuesta a las drogas de abuso; y cómo, según las características del sujeto, un consumo temprano de drogas producirá cambios a largo plazo en las propiedades reforzantes de la cocaína. Diferentes factores individuales, ambientales y biológicos, están modulando nuestra respuesta a las drogas, y serán relevantes ante el desarrollo de un trastorno por uso de sustancias. Además, la búsqueda de fármacos adecuados para el tratamiento de la dependencia a la cocaína sigue siendo de vital importancia, dada la escasez de recursos farmacológicos para combatirla.



## 9. Conclusiones



## **Conclusión general**

El consumo intensivo de drogas durante la adolescencia, el alto nivel de búsqueda de la novedad y la pertenencia al sexo femenino, son factores de vulnerabilidad que a largo plazo aumentan la sensibilidad de los efectos reforzantes de la cocaína y su consumo en la etapa adulta. Además, el topiramato potencia el efecto reforzante y la conducta de búsqueda de la cocaína, por lo que su utilidad en el tratamiento de la dependencia a la cocaína no parece conveniente.

## **Conclusiones por estudios**

**Estudio 1: El alto nivel de búsqueda de la novedad se presenta como un predictor de vulnerabilidad individual ante la adicción a la cocaína, siendo los altos buscadores los más sensibles a los efectos a largo plazo asociados a una administración intensiva de cocaína.**

1. El *binge* de cocaína administrado durante la adolescencia aumenta la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA sólo en animales HNS durante la edad adulta.
2. Por el contrario, el mismo *binge* dosis-creciente de cocaína administrado durante la adultez no produce este efecto.

## **Conclusiones**

**Estudio 2: El sexo de pertenencia también se presenta como un factor de vulnerabilidad ante la adicción a la cocaína a tener en cuenta, siendo las hembras más sensibles a los efectos a largo plazo asociados a una administración intensiva de etanol durante la adolescencia.**

1. El *binge* de etanol administrado durante la adolescencia aumenta la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína en ratones machos y hembras adultos.
2. El *binge* de etanol administrado durante la adolescencia incrementa en mayor medida el consumo de cocaína en ratones hembras adultas en comparación a los machos, así como la cantidad de cocaína autoadministrada.
3. El *binge* de etanol administrado durante la adolescencia tiene efectos a largo plazo sobre la respuesta locomotora inducida por varias dosis de cocaína en la etapa adulta de manera diferente en cada sexo: las hembras muestran sensibilización mientras que los machos tolerancia.

**Estudio 3: El topiramato no bloquea ni disminuye los efectos reforzantes condicionados de la cocaína, si no que los incrementa, aumentando el tiempo de extinción y el número de reinstauraciones de la preferencia inducida por la droga.**

1. El topiramato no bloquea ni la adquisición ni la expresión del refuerzo condicionado inducido con cocaína.
2. La administración contingente de topiramato junto a una dosis efectiva de cocaína aumenta sus efectos reforzantes en el CPL, e induce una reducción mayor de la TH y DAT en el ATV en comparación con la producida por la cocaína.
3. El topiramato administrado de manera contingente a la cocaína bloquea la extinción de la preferencia condicionada inducida por la cocaína.
4. El tratamiento crónico con topiramato no bloquea la adquisición del CPL inducido por cocaína, y además aumenta el número de reinstauraciones con dosis menores de la droga.
5. El tratamiento crónico con topiramato no reduce la conducta de búsqueda de la cocaína.





## 12. Bibliografía



- Agrawal A, Neale MC, Prescott CA, Kendler KS (2004) A twin study of early cannabis use and subsequent use and abuse/dependence of other illicit drugs. *Psychol Med.* Oct;34(7):1227-37. doi:10.1017/s0033291704002545
- Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2009) Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev* 59:253-77. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.08.002
- Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R, Botia B, Pierrefiche O, Vilpoux C, Naassila M (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 67:521-31. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.12.007.
- Alcázara MA, Verdejo A, Bouso J, Ortega J (2015) Búsqueda de sensaciones y conducta antisocial. *Anuario de Psicología Jurídica* 25 75–80
- Anker JJ, Carroll ME (2011) Females are more vulnerable to drug abuse than males: evidence from preclinical studies and the role of ovarian hormones. *Curr Top Behav Neurosci.* 8:73-96. doi: 10.1007/7854\_2010\_93
- Anker JJ, Holtz NA, Zlebnik N, Carroll ME (2009) Effects of allopregnanolone on the reinstatement of cocaine-seeking behavior in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl).* Mar;203(1):63-72. doi: 10.1007/s00213-008-1371-9.

## ***Bibliografía***

- Aragona BJ, Cleaveland NA, Stuber GD, Day JJ, Carelli RM, Wightman, RM (2008) Preferential Enhancement of Dopamine Transmission within the Nucleus Accumbens Shell by Cocaine Is Attributable to a Direct Increase in Phasic Dopamine Release Events. *Journal of Neuroscience*, 28(35), 8821–8831. doi:10.1523/jneurosci.2225-08.2008
- Arenas MC, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2014). Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Physiol Behav* 133: 152-160. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.028.
- Arenas, M.C., Aguilar, M.A., Montagud-Romero, S., Mateos-García, A., Navarro-Francés, C.I., Miñarro, J., Rodríguez-Arias, M. (2016). Influence of the novelty-seeking endophenotype on the rewarding effects of psychostimulant drugs in animal models. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 87–100. doi:10.2174/1570159x13666150921112841
- Arias F, Szerman N, Vega P, Mesias B, Basurte I, Morant C, Ochoa E, Poyo F, Babin F (2013) Cocaine abuse or dependency and other psychiatric disorders. Madrid study on dual pathology. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 6:121-8. doi: 10.1016/j.rpsm.2012.09.002
- Arnold AP (2014) Conceptual frameworks and mouse models for studying sex differences in physiology and disease: why compensation changes the game. *Exp Neurol*. Sep;259:2-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.01.021.
- Badanich KA, Adler KJ, Kirstein CL (2006) Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in

the nucleus accumbens septi. *Eur J Pharmacol* 550:95–106. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.08.034

Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2009) The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett* 457:120-124.

Baldaçara L, Cogo-Moreira H, Parreira BL, Diniz TA, Milhomem JJ, Fernandes CC, Lacerda AL (2016) Efficacy of topiramate in the treatment of crack cocaine dependence: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. Mar;77(3):398-406. doi: 10.4088/JCP.14m09377.

Baltieri DA, Daró FR, Ribeiro PL, de Andrade AG (2008) Comparing topiramate with naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Addiction*. Dec;103(12):2035-44. doi: 10.1111/j.1360-0443.2008.02355.x. Epub 2008 Oct 8.

Bardo MT, Bevins RA (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153 (1), 31-43.

Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG. (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res*. May;77(1-2):23-43. doi:10.1016/0166-4328(95)00203-0

Bardo MT, Neisewander JL, Kelly TH. (2013) Individual differences and social influences on the neurobehavioral pharmacology of abused drugs. *Pharmacol Rev*. Jan 23;65(1):255-90. doi: 10.1124/pr.111.005124. Print 2013 Jan.

## ***Bibliografia***

- Barry AE, King J, Sears C, Harville C, Bondoc I, Joseph K. (2016) Prioritizing Alcohol Prevention: Establishing Alcohol as the Gateway Drug and Linking Age of First Drink With Illicit Drug Use. *J Sch Health*. Jan;86(1):31-8. doi: 10.1111/josh.12351
- Batki SL, Pennington DL, Lasher B, Neylan TC, Metzler T, Waldrop A, Delucchi K, Herbst E (2014) Topiramate treatment of alcohol use disorder in veterans with posttraumatic stress disorder: a randomized controlled pilot trial. *Alcohol Clin Exp Res*. Aug;38(8):2169-77. doi: 10.1111/acer.12496.
- Becker JB, Hu M (2008) Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol*. 29:36-47 doi:10.1016/j.yfrne.2007.07.003
- Becker JB, Koob GF (2016) Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction. *Pharmacol Rev*. Apr;68(2):242-63. doi: 10.1124/pr.115.011163.
- Becker JB, Perry AN, and Westenbroek C (2012) Sex differences in the neural mechanisms mediating addiction: a new synthesis and hypothesis. *Biol Sex Differ* 3:14.
- Beckmann, J.S.; Marusich, J.A.; Gipson, C.D.; Bardo, M.T. Novelty seeking, incentive salience and acquisition of cocaine self- administration in the rat. *Behav. Brain Res.*, 2011, 216, 159-165. doi: 10.1016/j.bbr.2010.07.022
- Beery AK, Zucker I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*. Jan;35(3):565-72. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.002.

- Belcher AM, Volkow ND, Moeller FG, & Ferré S (2014) Personality traits and vulnerability or resilience to substance use disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, 18(4), 211–217. doi:10.1016/j.tics.2014.01.010
- Belin D, Berson N, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2011) High-Novelty-Preference Rats are Predisposed to Compulsive Cocaine Self-administration. *Neuropsychopharmacol* 36:569-79. doi: 10.1038/npp.2010.188
- Belin D, Deroche-Gamonet V, Jaber M (2007) Cocaine-induced sensitization is associated with altered dynamics of transcriptional responses of the dopamine transporter, tyrosine hydroxylase, and dopamine D2 receptors in C57Bl/6J mice. *Psychopharmacology* 193:567-578.
- Belin D, Mar A, Dalley J, Robbins T, Everitt B (2008) High Impulsivity Predicts the Switch to Compulsive Cocaine- Taking. *Science* 320:1352–5. doi: 10.1126/science.1158136
- Belin-Rauscent A y Belin D. (2012) Drug Addictions: An Historical and Ethological Overview. Chapter 1. Pags 4-19. *Addictions - From Pathophysiology to Treatment*. Edited by David Belin, ISBN 978-953-51-0783-5, pages, Publisher: InTech, Chapters publisher. doi:10.5772/52165
- Belin-Rauscent A, Fouyssac M, Bonci A, Belin D (2016) How Preclinical Models Evolved to Resemble the Diagnostic Criteria of Drug Addiction. *Biol Psychiatry*. Jan 1;79(1):39-46. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.01.004. Epub 2015 Jan 29.
- Berezina TL, Khouri AS, Winship MD, Fechtner RD (2012) Visual field and ocular safety during short-term vigabatrin treatment in cocaine abusers.

## ***Bibliografía***

Am J Ophthalmol. Aug;154(2):326-332.e2. doi:  
10.1016/j.ajo.2012.02.026.

Berkman ND, Brownley KA, Peat CM, Lohr KN, Cullen KE, Morgan LC, Bann CM, Wallace IF, Bulik CM (2015) Management and Outcomes of Binge-Eating Disorder [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0084317/pdf/PubMedHealth\\_PMH0084317.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0084317/pdf/PubMedHealth_PMH0084317.pdf)

Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev.* Dec;28(3):309-69.

Bevins RA, Klebaur JE, Bardo MT (1997) Individual differences in response to novelty, amphetamine-induced activity and drug discrimination in rats. *Behav Pharmacol.* Jun;8(2-3):113-23.

Bidwell, LC, Knopik, VS, Audrain-McGovern, J, Glynn, TR, Spillane, NS, Ray, LA, Riggs, NR, Guillot, CR, Pang, RD, Leventhal, AM (2015) Novelty seeking as a phenotypic marker of adolescent substance use. *Substance Abuse: Research and Treatment*, 9(S1), 1–10 (2015). doi:10.4137/SART.S22440.

Biscaia M, Fernández B, Higuera-Matas A, Miguéns M, Viveros M, Garcia-Lecumberri C, Ambrosio E (2008) Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55, 94- on morphine self-administration behaviour and the endogenous opioid system. *Neuropharmacology*, 54(5), 863–873.



- Blanco-Gandía MC, Mateos-García A, García-Pardo MP, Montagud-Romero S, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA. Effect of drugs of abuse on social behaviour: a review of animal models. *Behav Pharmacol.* 2015 Sep;26(6):541-70. doi: 10.1097/FBP.0000000000000162.
- Blanchard MM, Mendelsohn D, Stamp JA (2009) The HR/LR model: Further evidence as an animal model of sensation seeking. *Neurosci Biobehav Rev.* Jul;33(7):1145-54. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.009.
- Bobzean SA, Dennis TS, Addison BD, Perrotti LI (2010) Influence of sex on reinstatement of cocaine- conditioned place preference. *Brain Res Bull.*; 83:331–336.
- Bobzean SA, DeNobrega AK, Perrotti LI (2014) Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp Neurol.* Sep;259:64-74. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.01.022.
- Boissier JR, Simon P (1962) The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. *Thérapie* 17:1225-32
- Boissier JR, Simon P, Lwoff JM (1964) Use of a particular mouse reaction (hole-board method) for the study of psychotropic drugs. *Thérapie* 19:571-83
- Boutros N, Semenova S, Liu W, Crews FT, Markou A (2014) Adolescent intermittent ethanol exposure is associated with increased risky choice and decreased dopaminergic and cholinergic neuron markers in adult rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(2). 10.1083/ijnp/pyu003.

## ***Bibliografía***

Bradberry CW, Gruen RJ, Berridge CW, Roth RH (1991) Individual differences in behavioral measures: correlations with nucleus accumbens dopamine measured by microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav.* Aug;39(4):877-82. doi:10.1016/0091-3057(91)90047-6

Breslin FJ, Johnson BA, Lynch WJ (2010) Effect of topiramate treatment on ethanol consumption in rats. *Psychopharmacology (Berl).* Jan;207(4):529-34. doi: 10.1007/s00213-009-1683-4.

Broadwater MA, Liu W, Crews FT, Spear LP (2014) Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. *Developmental Neuroscience,* 36(3–4), 297–305.

Brodie JD, Case BG, Figueroa E, Dewey SL, Robinson JA, Wanderling JA, Laska EM (2009) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vigabatrin for the treatment of cocaine dependence in Mexican parolees. *Am J Psychiatry.* Nov;166(11):1269-77. doi: 10.1176/appi.ajp.2009.08121811.

Brown SA, Tapert SF. Adolescence and the trajectory of alcohol use: basic to clinical studies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1021:234-44.

Caballero A, Granberg R, Tseng KY (2016) Mechanisms contributing to prefrontal cortex maturation during adolescence. *Neurosci Biobehav Rev.* May 24. pii: S0149-7634(16)30087-2. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.013.

- Cain ME; Saucier DA; Bardo MT (2005) Novelty seeking and drug use: Contribution of an animal model. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 13, 367. doi:10.1037/1064-1297.13.4.367
- Caine SB, Bowen CA, Yu G, Zuzga D, Negus SS, Mello NK (2004) Effect of gonadectomy and gonadal hormone replacement on cocaine self-administration in female and male rats. *Neuropsychopharmacology.* May;29(5):929-42.
- Caine SB, Koob GF (1993) Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science*, 260 (5115), 1814-1816.
- Calabrese EJ (2008) An assessment of anxiolytic drug screening tests: Hormetic dose responses predominate. *Crit Rev Toxicol* 38:489-542. doi: 10.1080/10408440802014238
- Camarini R, Griffin WC 3rd, Yanke AB, Rosalina dos Santos B, Olive MF (2008) Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. *Brain Res.* Feb 8;1193:34-42. doi: 10.1016/j.brainres.2007.11.045.
- Carlezon WA Jr, Thomas MJ (2009) Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology.*;56 Suppl 1:122-32. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.075.
- Carrera MRA, Meijler MM, Janda KD (2004) Cocaine Pharmacology and Current Pharmacotherapies for Its Abuse. *ChemInform*, 35(51). doi:10.1002/chin.200451220

## ***Bibliografía***

- Carroll ME, Anker JJ (2010) Sex differences and ovarian hormones in animal models of drug dependence. *Horm Behav.* Jun;58(1):44-56. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.10.001.
- Carroll ME, Lynch WJ (2016) How to study sex differences in addiction using animal models. *Addict Biol.* Sep;21(5):1007-29. doi: 10.1111/adb.12400.
- Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 May;25(5):273-9.
- Carroll ME, Morgan AD, Lynch WJ, Campbell UC, Dess NK (2002) Intravenous cocaine and heroin self-administration in rats selectively bred for differential saccharin intake: phenotype and sex differences. *Psychopharmacology (Berl)* 161:304–313. doi:10.1007/s00213-002-1030-5
- Casey BJ, Giedd JN, Thomas KM (2000) Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol Psychol.* Oct;54(1-3):241-57. doi:10.1016/s0301-0511(00)00058-2
- Casey BJ, Jones, RM (2010) Neurobiology of the Adolescent Brain and Behavior: Implications for Substance Use Disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:1189-1201. doi:10.1016/j.jaac.2010.08.017
- Castells X, Casas M, Pérez-Mañá C, Roncero C, Vidal X, Capellà D (2010) Efficacy of psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* Feb 17;(2):CD007380. doi: 10.1002/14651858.CD007380.pub3
- Cecchi M, Capriles N, Watson SJ, Akil H (2007) Beta1 adrenergic receptors in the bed nucleus of stria terminalis mediate differential responses to

opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. Mar;32(3):589-99. doi.org/10.1038/sj.npp.1301140

Centers for Disease Control (2015) Youth Risk Behavior Surveillance System (YRBSS). Available at: <http://www.cdc.gov/healthyouth/yrbs/index.htm>

Cicero TJ, Aylward SC, Meyer ER (2003) Gender differences in the intravenous self-administration of mu opiate agonists. *Pharmacol Biochem Behav*. Feb;74(3):541-9.

Cloninger R, Bayon C, y Svrakic D (1998) Measurement of temperament and character in mood disorders: a model of fundamental states as personality types. *Journal of Affective Disorders*, 51, 21-32. doi:10.1016/s0165-0327(98)00153-0

Cloninger, CRA (1987) systematic method for clinical description and classification of personality variants: A proposal. *Arch Gen Psychiatry*, 44(6), 573-588.

Cooper DA, Kimmel HL, Manvich DF, Schmidt KT, Weinschenker D, Howell LL (2014) Effects of pharmacologic dopamine  $\beta$ -hydroxylase inhibition on cocaine-induced reinstatement and dopamine neurochemistry in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*. Jul;350(1):144-52. doi: 10.1124/jpet.113.212357.

Crews F, He J, Hodge C (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 86(2):189–99. doi:10.1016/j.pbb.2006.12.001

## ***Bibliografia***

Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer RC 3rd, Knapp DJ (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin Exp Res.* Nov;24(11):1712-23.

Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer RC, Knapp, DJ (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(11), 1712–1723.

Crews FT, Mdzinarishvili A, Kim D, He J, Nixon K (2006) Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience.*;137(2):437-45.

Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM (2002) Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J Comp Neurol.* Nov 11;453(2):116-30.

Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM (2008) Increasing Interaction of amygdalar afferents with GABAergic interneurons between birth and adulthood. *Cereb Cortex.* Jul;18(7):1529-35. Epub 2007 Oct 29.

Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN (2003) Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry.* Jun;160(6):1041-52. Review. doi:10.1176/appi.ajp.160.6.1041

Chefer VI, Zakharova I, Shippenberg TS (2003) Enhanced responsiveness to novelty and cocaine is associated with decreased basal dopamine uptake and release in the nucleus accumbens: Quantitative microdialysis in rats

under transient conditions. *J Neurosci* 23:3076-3084. doi: 0270-6474/03/233076-09\$15.00/0

Chen K, Kandel DB (1995) The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. *Am J Public Health*. Jan;85(1):41-7. doi:10.2105/ajph.85.1.41

Chin J., O. Sternin, H.B.K. Wu, S. Burrell, D. Lu, S. Jenab, L.I. Perrotti, V. Quinones-Jenab (2002) Endogenous gonadal hormones modulate behavioral and neurochemical responses to acute and chronic cocaine administration, *Brain Res*. 945 123–130.

Chong DJ, Lerman AM (2016) Practice Update: Review of Anticonvulsant Therapy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. Apr;16(4):39. doi: 10.1007/s11910-016-0640-y.

Dakwar E, Nunes EV (2016) New Directions in Medication-Facilitated Behavioral Treatment for Substance Use Disorders. *Curr Psychiatry Rep*. Jul;18(7):64. doi: 10.1007/s11920-016-0703-4.

Darland T, Mauch JT, Meier EM, Hagan SJ, Dowling JE, Darland DC (2012) Sulpiride, but not SCH23390, modifies cocaine-induced conditioned place preference and expression of tyrosine hydroxylase and elongation factor 1alpha in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 103:157-167.

Davis BA, Clinton SM, Akil H, Becker JB (2008) The effects of novelty-seeking phenotypes and sex differences on acquisition of cocaine self-administration in selectively-bred High-Responder and Low-Responder rats. *Pharmacol Biochem Behav* 90:331–8. doi:10.1016/j.pbb.2008.03.008

## ***Bibliografía***

- Daza-Losada M, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro, J (2009) Acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice pre-treated with MDMA or cocaine during adolescence. *Addict Biol* 14:447-456. doi: 10.1111/j.1369-1600.2009.00173.x.
- De Bellis MD, Clark DB, Beers SR, Soloff PH, Boring AM, Hall J, Kersh A, Keshavan MS (2000) Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. *Am J Psychiatry*. May;157(5):737-44.
- De Bellis MD, Narasimhan A, Thatcher DL, Keshavan MS, Soloff P, Clark DB (2005) Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. Sep;29(9):1590-600.
- De La Garza R 2nd, Bubar MJ, Carbone CL, Moeller FG, Newton TF, Anastasio NC, Harper TA, Ware DL, Fuller MA, Holstein GJ, Jayroe JB, Bandak SI, Reiman KZ, Neale AC, Pickford LB, Cunningham KA Evaluation of the dopamine  $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H) inhibitor nopicostat in participants who meet criteria for cocaine use disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015 Jun 3;59:40-8. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.01.009.
- De la Peña I; Gonzales EL; de la Peña JB; Kim BN; Han DH; Shin CY; Cheong JH (2014) Individual differences in novelty-seeking behavior in spontaneously hypertensive rats: Enhanced sensitivity to the reinforcing effect of methylphenidate in the high novelty-preferring subpopulation. *J. Neurosci. Methods*.. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.08.019.
- De la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, Camí, J. (2004). Human Pharmacology of MDMA. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26(2), 137–144. doi:10.1097/00007691-200404000-00009



- De Sousa AA, De Sousa J, Kapoor H (2008) An open randomized trial comparing disulfiram and topiramate in the treatment of alcohol dependence. *J Subst Abuse Treat.* Jun;34(4):460-3.
- Degenhardt L, O'Loughlin C, Swift W, Romaniuk H, Carlin J, Coffey C, Hall W, Patton G (2013) The persistence of adolescent binge drinking into adulthood: findings from a 15-year prospective cohort study. *BMJ Open.* 3:e003015. doi: 10.1136/bmjopen-2013-003015
- Dellu F, Piazza PV, Mayo W, Le Moal M, Simon H (1996) Novelty seeking in rats-biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* 34:136-45.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, 305 (5686), 1014-1017.
- Di Chiara G (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend.* May;38(2):95-137.
- Dickson, P.E.; Ndukum, J.; Wilcox, T.; Clark, J.; Roy, B.; Zhang, L.; Li, Y.; Lin, D.T.; Chesler, E.J (2015). Association of novelty-related behaviors and intravenous cocaine self-administration in Diversity Outbred mice. *Psychopharmacology*, , 232, 1011-1024. doi: 10.1007/s00213-014-3737-5. Epub 2014 Sep 20.
- Do Couto BR, Rodríguez-Arias M, Fuentes S, Gagliano H, Armario A, Miñarro J, Aguilar MA (2011) Adolescent pre-exposure to ethanol or MDMA prolongs the conditioned rewarding effects of MDMA. *Physiol Behav.* 103:585-93. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.012

## ***Bibliografía***

- Echeverry-Alzate V, Giné E, Bühler KM, Calleja-Conde J, Olmos P, Gorriti MA, et al. (2014) Effects of Topiramate on Ethanol-Cocaine Interactions and DNA Methyltransferase Gene Expression in the Rat Prefrontal Cortex. *Br J Pharmacol* 171:3023-3036. doi: 10.1111/bph.12636.
- EDADES (2015) Encuesta sobre alcohol y drogas en España, 1995-2013. Delegación del gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Políticas Sociales. Gobierno de España.
- Ehlers CL, Liu W, Wills DM, Crews FT (2013) Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience*, 244, 1–15.
- Elkashef A, Kahn R, Yu E, Iturriaga E, Li SH, Anderson A, Chiang N, Ait-Daoud N, Weiss D, McSherry F, Serpi T, Rawson R, Hrymoc M, Weis D, McCann M, Pham T, Stock C, Dickinson R, Campbell J, Gorodetzky C, Haning W, Carlton B, Mawhinney J, Li MD, Johnson BA (2012) Topiramate for the treatment of methamphetamine addiction: a multi-center placebo-controlled trial. *Addiction*. Jul;107(7):1297-306. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03771.x. Epub 2012 Feb 28.
- Ellgren M, Spano S, Hurd Y (2007) Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(3), 607–615.
- EMCDDA (2016), Informe Europeo Sobre Drogas. Tendencias y novedades. Observatorio europeo de las drogas y las toxicomanías.

- Ennaceur A, Chazot PL. Preclinical animal anxiety research - flaws and prejudices. *Pharmacol Res Perspect*. 2016 Mar 8;4(2):e00223. doi: 10.1002/prp2.223. eCollection 2016 Apr.
- Ernst M, Nelson EE, Jazbec S, McClure EB, Monk CS, Leibenluft E, Blair J, Pine DS (2005) Amygdala and nucleus accumbens in responses to receipt and omission of gains in adults and adolescents. *Neuroimage*. May 1;25(4):1279-91.
- Eshel N, Nelson EE, Blair RJ, Pine DS, Ernst M (2007) Neural substrates of choice selection in adults and adolescents: development of the ventrolateral prefrontal and anterior cingulate cortices. *Neuropsychologia*. Mar 25;45(6):1270-9.
- Estelles J, Lluch J, Rodriguez-Arias M, Aguilar MA, Minarro J (2007) Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. *Brain Res Bull* 71:393–403. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.10.008
- ESTUDES (2016) Encuesta sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias en España, 1994-2014. Delegación del gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Política Social. Gobierno de España.
- Fattore L, Fadda P, Fratta W (2009) Sex differences in the self-administration of cannabinoids and other drugs of abuse. *Psychoneuroendocrinology*. Dec;34 Suppl 1:S227-36. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.08.008.
- Fattore L, Melis M (2016) Sex differences in impulsive and compulsive behaviors: a focus on drug addiction. *Addict Biol*. Sep;21(5):1043-51. doi: 10.1111/adb.12381.

## ***Bibliografia***

- Fattore L, Spano MS, Altea S, Angius F, Fadda P, Fratta W (2007) Cannabinoid self-administration in rats: sex differences and the influence of ovarian function. *Br J Pharmacol.* Nov;152(5):795-804.
- Fechtner RD, Khouri AS, Figueroa E, Ramirez M, Federico M, Dewey SL, Brodie JD (2006) Short-term treatment of cocaine and/or methamphetamine abuse with vigabatrin: ocular safety pilot results. *Arch Ophthalmol.* Sep;124(9):1257-62.
- Feinn R, Curtis B, Kranzler HR (2016) Balancing risk and benefit in heavy drinkers treated with topiramate: implications for personalized care. *J Clin Psychiatry.* Mar;77(3):e278-82. doi: 10.4088/JCP.15m10053.
- Feinn R, Curtis B, Kranzler HR (2016) Balancing risk and benefit in heavy drinkers treated with topiramate: implications for personalized care. *J Clin Psychiatry.* Mar;77(3):e278-82. doi: 10.4088/JCP.15m10053.
- Festa E.D., S.J. Russo, F.M. Gazi, T. Niyomchai, L.M. Kemen, S-N. Lin, R. Foltz, S. Jenab, V. Quinones-Jenab, (2004) Sex differences in cocaine- induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels, *Neuropharmacology* 46 672–687.
- File SE, Seth P (2003) A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol.* Feb 28;463(1-3):35-53.
- Fleming RL, Acheson SK, Moore SD, Wilson WA, Swartzwelder HS. In the rat, chronic intermittent ethanol exposure during adolescence alters the ethanol sensitivity of tonic inhibition in adulthood. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012 Feb;36(2):279-85. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01615.x.

- Flórez G, García-Portilla P, Alvarez S, Saiz PA, Nogueiras L, Bobes J (2008) Using topiramate or naltrexone for the treatment of alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res.* Jul;32(7):1251-9. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00680.x.
- Gabriel KI, Cunningham CL (2005) Effects of topiramate on ethanol and saccharin consumption and preferences in C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res.* Jan;29(1):75-80.
- Gass JT, Olive MF (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75:218-265.
- Gibbs JW 3rd, Sombati S, DeLorenzo RJ, Coulter DA (2000) Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia.*;41 Suppl 1:S10-6.
- Giedd JN (2004) Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* Jun;1021:77-85.
- Giedd JN (2008) The teen brain: insights from neuroimaging. *J Adolesc Health.* Apr;42(4):335-43. doi: 10.1016/j.jadohealth.2008.01.007
- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos, A, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nature neuroscience*, 2(10), 861-863.
- Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM (2009) Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. *Disease-a-Month*, 55(1), 6–38. doi:10.1016/j.disamonth.2008.10.002

## ***Bibliografia***

- Gong W, Neill DB, Justine JB (1996) Locomotor response to novelty does not predict cocaine place preference conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53:191-6. doi:10.1016/0091-3057(95)00174-3
- Grabowski J, Rhoades H, Schmitz J, Stotts A, Daruzska LA, Creson D, Moeller FG (2001) Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: a double-blind randomized clinical trial. *J Clin Psychopharmacol.* Oct;21(5):522-6.
- Grabowski J, Rhoades H, Stotts A, Cowan K, Kopecky C, Dougherty A, Moeller FG, Hassan S, Schmitz J (2004) Agonist-like or antagonist-like treatment for cocaine dependence with methadone for heroin dependence: two double-blind randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology.* May;29(5):969-81.
- Graf EN, Hoks MA, Baumgardner J, Sierra J, Vranjkovic O, Bohr C, Baker DA, Mantsch JR (2011) Adrenal activity during repeated long-access cocaine self-administration is required for later CRF-Induced and CRF-dependent stressor-induced reinstatement in rats. *Neuropsychopharmacology*, 36 (7), 1444-1454.
- Grant BF, Stinson FS, Harford TC (2001) Age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol abuse and dependence: a 12-year follow-up. *J Subst Abuse.* 13:493-504. doi:10.1016/s0899-3289(01)00096-7
- Grant JD, Scherrer JF, Lynskey MT, Lyons MJ, Eisen SA, Tsuang MT, True WR, Bucholz KK (2006) Adolescent alcohol use is a risk factor for adult alcohol and drug dependence: evidence from a twin design. *Psychol Med.* Jan;36(1):109-18. doi:10.1017/s0033291705006045

- Gremel CM, Gabriel KI, Cunningham CL (2006) Topiramate does not affect the acquisition or expression of ethanol conditioned place preference in DBA/2J or C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res.* May;30(5):783-90.
- Gryder DS, Rogawski MA (2003) Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *J Neurosci.* Aug 6;23(18):7069-74.
- Gulley JM, Juraska, JM (2013) The effects of abused drugs on adolescent development of corticolimbic circuitry and behavior. *Neuroscience*, 249, 3–20. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.05.026
- Hanlon CA, Beveridge TJR, Porrino LJ (2013) Recovering from cocaine: Insights from clinical and preclinical investigations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(9), 2037–2046. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.04.007
- Hansson AC, Nixon K, Rimondini R, Damadzic R, Sommer WH, Eskay R, Crews FT, Heilig M (2010) Long-term suppression of forebrain neurogenesis and loss of neuronal progenitor cells following prolonged alcohol dependence in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* Jun;13(5):583-93. doi: 10.1017/S1461145710000246.
- Hargreaves GA, McGregor IS (2007) Topiramate moderately reduces the motivation to consume alcohol and has a marked antidepressant effect in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* Nov;31(11):1900-7.
- Helfer JL, Calizo LH, Dong WK, Goodlett CR, Greenough WT, Klintsova AY (2009) Binge-like postnatal alcohol exposure triggers cortical gliogenesis

## ***Bibliografía***

in adolescent rats. *J Comp Neurol.* May 20;514(3):259-71. doi: 10.1002/cne.22018.

Hibell B, Guttormsson U, Ahlström S, Balakireva O, Bjarnason T, Kokkevi A, Kraus L (2011) The 2011 ESPAD Report: Substance use among students in 36 European Countries. Stockholm: The Swedish Council for Information on Alcohol and other Drugs (CAN) [http://www.espad.org/Uploads/ESPAD\\_reports/2011/The\\_2011\\_ESPAD\\_Report\\_FULL\\_2012\\_10\\_29.pdf](http://www.espad.org/Uploads/ESPAD_reports/2011/The_2011_ESPAD_Report_FULL_2012_10_29.pdf)

Higuera-Matas A, Soto-Montenegro M, del Olmo N, Miguéns M, Torres I, Vaquero J, ... Ambrosio, E (2008) Augmented acquisition of cocaine self-administration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 806–813.

Hilderbrand ER, Lasek AW (2014) Sex differences in cocaine conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Neuroreport.* January 22; 25(2): 105–109. doi:10.1097/WNR.0000000000000053.

Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006) Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 160:739-46. doi:10.1001/archpedi.160.7.739

Hooks MS, Jones GH, Liem BJ, Justice JB Jr. (1992a) Sensitization and individual differences to IP amphetamine, cocaine, or caffeine following repeated intracranial amphetamine infusions. *Pharmacol Biochem Behav.* Nov;43(3):815-23.



- Hooks MS, Jones GH, Neill DB, Justice JB Jr. (1992b) Individual differences in amphetamine sensitization: dose-dependent effects. *Pharmacol Biochem Behav.* Jan;41(1):203-10
- Hooks MS, Jones GH, Smith AD, Neill DB, Justice JB (1991) Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse* 9:121–8 doi:10.1002/syn.890090206
- Hu M, Crombag HS, Robinson TE, Becker JB. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Jan;29(1):81-5.
- Hutchison MA, Albaugh DL, Riley AL (2010) Exposure to alcohol during adolescence alters the aversive and locomotor-activating effects of cocaine in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 97:370-6. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.006
- Hutchison MA, Riley AL (2012) Ethanol exposure during either adolescence or adulthood alters the rewarding effects of cocaine in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 101:458-64. doi:10.1016/j.pbb.2012.02.007
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* Oct 20;387(2):167-78.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci,* 2(10), 695–703. doi:10.1038/35094560
- Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle

## ***Bibliografia***

complex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 27–78.  
doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.004

Jacobs W, Goodson P, Barry AE, McLeroy KR (2016) The Role of Gender in Adolescents' Social Networks and Alcohol, Tobacco, and Drug Use: A Systematic Review. *J Sch Health*. May;86(5):322-33. doi: 10.1111/josh.12381.

Jacobus J, Tapert SF (2013) Neurotoxic effects of alcohol in adolescence. *Annu Rev Clin Psychol*.;9:703-21. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-050212-185610.

Johnson BA (2004) Topiramate-induced neuromodulation of cortico-mesolimbic dopamine function: a new vista for the treatment of comorbid alcohol and nicotine dependence? *Addict Behav* 29:1465-1479. doi:10.1016/j.addbeh.2004.06.014

Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ (2003) Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *Lancet*. May 17;361(9370):1677-85.

Johnson BA, Ait-Daoud N, Wang XQ, Penberthy JK, Javors MA, Seneviratne C, et al. (2013a) Topiramate for the treatment of cocaine addiction: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry* 70:1338-1346. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.2295

Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Gunderson EW, Haughey HM, Wang XQ, et al. (2013b) Topiramate's effects on cocaine-induced subjective

mood, craving and preference for money over drug taking. *Addict Biol* 18:405-416. doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00499.x.

Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Javors MA, Harrison JM, Elkashef A, Mojsiak J, Li SH, Bloch DA (2006) A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of ondansetron in the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* Oct 1;84(3):256-63.

Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Wells LT, Wallace CL, Dawes MA, et al. (2007) Effects of acute topiramate dosing on methamphetamine-induced subjective mood. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:85-98.

Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG, Schulenberg JE (2008) (n.d.). Monitoring the future: National Results on Adolescent Drug Use: Overview of Key Findings,. *PsycEXTRA Dataset*. doi:10.1037/e560352009-001

Kabbaj M (2006) Individual differences in vulnerability to drug abuse: The high responders/low responders model. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:513-20. doi: 10.2174/187152706778559318

Kalivas PW (2007) Neurobiology of Cocaine Addiction: Implications for New Pharmacotherapy. *American Journal on Addictions*, 16(2), 71–78. doi:10.1080/10550490601184142

Kalivas PW, McFarland K (2003) Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*, 168(1-2), 44–56. doi:10.1007/s00213-003-1393-2

## ***Bibliografia***

- Kalivas PW, Volkow ND (2011) New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry*. Oct;16(10):974-86. doi: 10.1038/mp.2011.46.
- Kampman KM, Patinas H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, et al. (2004) A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 75:233-240.
- Kampman KM, Pettinati HM, Lynch KG, Spratt K, Wierzbicki MR, O'Brien CP (2013) A double-blind, placebo-controlled trial of topiramate for the treatment of comorbid cocaine and alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 133:94-99. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.05.026.
- Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, et al. (2008) New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:425-438.
- Kavitharaj NK, Vijayammal PL (1999) Nicotine administration induced changes in the gonadal functions in male rats. *Pharmacology*. Jan;58(1):2-7.
- Kerstetter KA, Aguilar VR, Parrish AB, Kippin TE (2008) Protracted time-dependent increases in cocaine-seeking behavior during cocaine withdrawal in female relative to male rats. *Psychopharmacology (Berl)*. May;198(1):63-75. doi: 10.1007/s00213-008-1089-8.
- Kim JH, Lawrence AJ (2014) Drugs currently in Phase II clinical trials for cocaine addiction. *Expert Opin Investig Drugs* 23:1105-1122. doi:10.1517/13543784.2014.915312.

- Kirby T, Barry AE (2012) Alcohol as a gateway drug: a study of US 12th graders. *J Sch Health*. Aug;82(8):371-9. doi: 10.1111/j.1746-1561.2012.00712.x.
- Klebaur JE, Bardo MT (1999) Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 63:131–6. doi:10.1016/s0091-3057(98)00258-5
- Klebaur JE, Bevins RA, Segar TM, Bardo MT (2001) Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav Pharmacol* 12:267–75. doi:10.1097/00008877-200107000-00005
- Kliethermes CL, Crabbe JC (2006) Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85:57-65. doi: 10.1016/j.pbb.2006.07.007
- Kliethermes CL, Kamens HM, Crabbe JC (2007) Drug reward and intake in lines of mice selectively bred for divergent exploration of a hole board apparatus. *Genes Brain Behav* 6:608-18. doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00289.x
- Knapp CM, Ciraulo DA, Sarid-Segal O, Richardson MA, Devine E, Streeter CC, Oscar-Berman M, Surprise C, Colaneri L, Putnam M, Waters M, Richambault C (2015) Zonisamide, topiramate, and levetiracetam: efficacy and neuropsychological effects in alcohol use disorders. *J Clin Psychopharmacol*. Feb;35(1):34-42. doi: 10.1097/JCP.0000000000000246.

## ***Bibliografia***

- Koob G, Kreek MJ (2007) Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry*. Aug;164(8):1149-59.
- Koob GF (2009) Brain stress systems in the amygdala and addiction. *Brain Res*. Oct 13;1293:61-75. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.038.
- Koob GF (2013) Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Front Psychiatry*. 2013 Aug 1;4:72. doi: 10.3389/fpsy.2013.00072. eCollection 2013.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science*, 278(5335), 52–58. doi:10.1126/science.278.5335.52
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. Jan;35(1):217-38. doi: 10.1038/npp.2009.110
- Koob, G. F., Arends, M. A., & Le Moal, M. (2014). Introduction to the Neuropsychopharmacology of Drug Addiction. *Drugs, Addiction, and the Brain*, 29–63. doi:10.1016/b978-0-12-386937-1.00002-7
- Koss WA, Sadowski RN, Sherrill LK, Gulley JM, Juraska JM (2012) Effects of ethanol during adolescence on the number of neurons and glia in the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala of adult male and female rats. *Brain Res*. 1466:24-32. doi: 10.1016/j.brainres.2012.05.023
- Kosten TA, Miserendino MJD (1998) Dissociation of novelty- and cocaine-conditioned locomotor activity from cocaine place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 60:785–91.

- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA. Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci.* 1995 Sep;16(9):295-303.
- Latini G, Verrotti A, Manco R, Scardapane A, Del Vecchio A, Chiarelli F (2008) Topiramate: its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Mini Rev Med Chem.* Jan;8(1):10-23.
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G (1999) Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* Nov;23(7):993-1010.
- Laviola G, Macrì S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev.* 27:19-31.
- Le Foll B, Justinova Z, Wertheim CE, Barnes C, Goldberg SR (2008) Topiramate does not alter nicotine or cocaine discrimination in rats. *Behav Pharmacol* 19:13-20. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282f3cf84.
- Lecca D, Valentini V, Cacciapaglia F, Acquas E, Di Chiara G (2007) Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on in vivo nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study. *Psychopharmacology*, 194(1), 103–116. doi:10.1007/s00213-007-0815-y
- Lenroot RK, Giedd JN (2006) Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev.*;30(6):718-29.
- Lessem JM, Hopfer CJ, Haberstick BC, Timberlake D, Ehringer MA, Smolen A, Hewitt JK (2006) Relationship between adolescent marijuana use and

## ***Bibliografia***

- young adult illicit drug use. *Behav Genet.* Jul;36(4):498-506. doi:10.1007/s10519-006-9064-9
- Lewis B, Hoffman LA, Nixon SJ (2014) Sex differences in drug use among polysubstance users. *Drug Alcohol Depend.* Dec 1;145:127-33. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.10.003.
- Leyton M, Boileau I, Benkelfat C, Diksic M, Baker G, Dagher A (2002) Amphetamine-induced increases in extracellular dopamine, drug wanting, and novelty seeking: a PET/[11C]raclopride study in healthy men. *Neuropsychopharmacology* 27:1027–1035. doi:10.1016/s0893-133x(02)00366-4
- Li Q, Wilson WA, Swartzwelder HS. Developmental differences in the sensitivity of hippocampal GABAA receptor-mediated IPSCs to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003 Dec;27(12):2017-22.
- Lin SK (2013) Pharmacological means of reducing human drug dependence: a selective and narrative review of the clinical literature. *Br J Clin Pharmacol* 77:242-252. doi: 10.1111/bcp.12163.
- López-Frías M, de la fe Fernandez M, Planells E, Miranda MT, Mataix J, Llopis J. Alcohol consumption and academic performance in a population of Spanish high school students. *J Stud Alcohol.* 2001 Nov;62(6):741-4.
- Lynch WJ, Bond C, Breslin FJ, Johnson BA (2011) Severity of drinking as a predictor of efficacy of the combination of ondansetron and topiramate in rat models of ethanol consumption and relapse. *Psychopharmacology (Berl).* Sep;217(1):3-12. doi: 10.1007/s00213-011-2253-0. Epub 2011 Mar 22.



- Lynch WJ, Carroll ME (1999) Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. May;144(1):77-82.
- Lynch WJ, Kiraly DD, Caldarone BJ, Picciotto MR, Taylor JR (2007) Effect of cocaine self-administration on striatal PKA-regulated signaling in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl)*. Apr;191(2):263-71
- Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME (2002) Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. Nov;164(2):121-37
- Mallette JR, Casale JF, Jordan J, Morello DR, Beyer PM (2016) Geographically Sourcing Cocaine's Origin – Delineation of the Nineteen Major Coca Growing Regions in South America. *Scientific Reports*, 6, 23520. doi:10.1038/srep23520
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001) Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res*. 121:189-97. doi:10.1016/s0166-4328(01)00164-4
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2005) Sensitization to the rewarding effects of morphine depends on dopamine. *NeuroReport*, 16(2), 201–205. doi:10.1097/00001756-200502080-00028
- Manzanedo C, García-Pardo MP, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA (2012) Pre-treatment with high doses of cocaine decreases the reinforcing effects of cocaine in the conditioned place preference paradigm. *Neurosci Lett* 516:29-33. doi: 10.1016/j.neulet.2012.03.044

## ***Bibliografía***

- Martínez M, Miñarro J, Simón V (1991) análisis etoexperimental de la conducta agonística en ratones. *Psicológica*, 12, 1-22
- Mayet A, Legleye S, Beck F, Falissard B, Chau N. (2016) The Gateway Hypothesis, Common Liability to Addictions or the Route of Administration Model A Modelling Process Linking the Three Theories. *Eur Addict Res.*;22(2):107-17. doi: 10.1159/000439564
- McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res.* Jun;101(2):129-52.
- McElroy SL, Guerdjikova AI, Mori N, O'Melia AM (2012) Current pharmacotherapy options for bulimia nervosa and binge eating disorder. *Expert Opin Pharmacother.* Oct;13(14):2015-26. doi: 10.1517/14656566.2012.721781.
- McHugh PC, Buckley DA (2015) The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. *Vitam Horm.*;98:339-69. doi: 10.1016/bs.vh.2014.12.009.
- Medina KL, McQueeney T, Nagel BJ, Hanson KL, Schweinsburg AD, Tapert SF (2008) Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. *Alcohol Clin Exp Res.* Mar;32(3):386-94. doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00602.x.
- Menéndez-Delmestre R, Segarra AC. Testosterone is essential for cocaine sensitization in male rats. *Physiol Behav.* 2011 Jan 10;102(1):96-104. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.09.025.

- Meyer AC; Rahman S; Charnigo RJ; Dwoskin LP; Crabbe JC; Bardo MT (2010) Genetics of novelty seeking, amphetamine self- administration and reinstatement using inbred rats. *Genes Brain Behav.*, , 9, 790-8. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00616.x.
- Minozzi S, Cinquini M, Amato L, Davoli M, Farrell MF, Pani PP et al. (2015) Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev* 17:4:CD006754. doi: 10.1002/14651858.CD006754.pub4.
- Miranda R Jr, MacKillop J, Monti PM, Rohsenow DJ, Tidey J, Gwaltney C, Swift R, Ray L, McGeary J (2008) Effects of topiramate on urge to drink and the subjective effects of alcohol: a preliminary laboratory study. *Alcohol Clin Exp Res.* Mar;32(3):489-97. doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00592.x. Epub 2008 Jan 22.
- Mitchell JM, Cunningham CL, Mark GP (2005) Locomotor activity predicts acquisition of self-administration behavior but not cocaine intake. *Behav Neurosci.* Apr;119(2):464-72. doi:10.1037/0735-7044.119.2.464
- Moeller FG, Dougherty DM, Barratt ES, Schmitz JM, Swann AC, Grabowski J The impact of impulsivity on cocaine use and retention in treatment. *J Subst Abuse Treat.* 2001 Dec;21(4):193-8.
- Molet J, Hervé D, Thiébot MH, Hamon M, Lanfumey L (2013) Juvenile ethanol exposure increases rewarding properties of cocaine and morphine in adult DBA/2J mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 23:1816-25. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.03.010
- Montagud-Romero S, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2014) The Novelty-Seeking Phenotype

## ***Bibliografia***

Modulates the Long-Lasting Effects of Intermittent Ethanol Administration during Adolescence. PLoS ONE 9:e92576. doi:10.1371/journal.pone.0092576

Mooney ME, Schmitz JM, Moeller FG, Grabowski J Safety, tolerability and efficacy of levodopa-carbidopa treatment for cocaine dependence: two double-blind, randomized, clinical trials. Drug Alcohol Depend. 2007 May 11;88(2-3):214-23.

Moore CF, Lycas MD, Bond CW, Johnson BA, Lynch WJ (2014a) Acute and chronic administration of a low-dose combination of topiramate and ondansetron reduces ethanol's reinforcing effects in male alcohol preferring (P) rats. Exp Clin Psychopharmacol 22:35-42. doi: 10.1037/a0035215.

Moore CF, Lynch WJ (2015) Alcohol preferring (P) rats as a model for examining sex differences in alcohol use disorder and its treatment. Pharmacol Biochem Behav. Feb 21;132:1-9. doi: 10.1016/j.pbb.2015.02.014.

Moore CF, Protzuk OA, Johnson BA, Lynch WJ (2014b) The efficacy of a low dose combination of topiramate and naltrexone on ethanol reinforcement and consumption in rat models. Pharmacol Biochem Behav. Jan;116:107-15. doi: 10.1016/j.pbb.2013.11.013.

Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K (2010) Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. Hippocampus. May;20(5):596-607. doi: 10.1002/hipo.20665.

Moser P, Wolinsky T, Duxon M, Porsolt RD (2011) How good are current approaches to nonclinical evaluation of abuse and dependence? *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, 336 (3), 588-595.

Mugford RA, Nowell NW (1970) Pheromones and their effect on aggression in mice. *Nature* 226:967-268. doi: 10.1038/226967a0

Nadal R (2008) La búsqueda de sensaciones y su relación con la vulnerabilidad a la adicción y al estrés. *Adicciones* 20:59-72. doi:10.20882/adicciones.289

Nagel BJ, Schweinsburg AD, Phan V, Tapert SF. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. *Psychiatry Res.* 2005 Aug 30;139(3):181-90.

Navarrete F, Rubio G, Manzanares J (2014) Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol.* Sep;19(5):862-73. doi: 10.1111/adb.12058.

Neisewander JL, Peartree NA, Pentkowski NS (2012). Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction. *Psychopharmacology (Berl)*224:33–56.

Nestler E (2005) The Neurobiology of Cocaine Addiction. *SPP*, 3(1), 4–10. doi:10.1151/spp05314

Nestler EJ (2001) Molecular Neurobiology of Addiction. *American Journal on Addictions*, 10(3), 201–217. doi:10.1080/105504901750532094

## ***Bibliografia***

Nguyen SA, Malcolm R, Middaugh LD (2007) Topiramate reduces ethanol consumption by C57BL/6 mice. *Synapse*. Mar;61(3):150-6.

NIAAA Newsletter (2004) National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism. Department of health and human Services-National Institutes of Health website. Office of Research Translation and Communications. Bethesda, Maryland. Available: [http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter\\_Number3.pdf](http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf)

Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem*. 2002 Dec;83(5):1087-93.

Nixon K, Morris S, Liput D, Kelso M (2010) Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol*, 44, 39–56.

Norbury, A, Husain, M (2015) Sensation-seeking: Dopaminergic modulation and risk for psychopathology. *Behavioural Brain Research*, 288, 79–93. doi:10.1016/j.bbr.2015.04.015

Nuijten M, Blanken P, van den Brink W, Hendriks V (2014) Treatment of crack-cocaine dependence with topiramate: a randomized controlled feasibility trial in The Netherlands. *Drug Alcohol Depend* 138:177-184. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.02.024.

O'Connor EC, Chapman K, Butler P, Mead AN (2011) The predictive validity of the rat-self administration model for abuse liability. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 35, 912-938.

Pandey SC, Sakharkar AJ, Tang L, Zhang H (2015) Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety

- and alcohol intake during adulthood. *Neurobiology of Disease*, 82, 607–619.
- Paparrigopoulos T, Tzavellas E, Karaiskos D, Kourlaba G, Liappas I (2011) Treatment of alcohol dependence with low-dose topiramate: an open-label controlled study. *BMC Psychiatry*. Mar 14;11:41. doi: 10.1186/1471-244X-11-41.
- Pascual M, Blanco A, Cauli O, Minarro J, Guerri, C (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*, 25(2), 541–550.
- Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Miñarro J, Guerri C (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci*. 25:541-50. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x
- Pascual M, Boix J, Felipe V, Guerri C (2009) Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neurochem*. 108:920-31. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05835.x
- Pascual M, Pla A, Miñarro J, Guerri C (2014) Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol and Alcoholism*, 49(2), 187–192.
- Paus T (2005) Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. *Trends Cogn Sci*. Feb;9(2):60-8.

## ***Bibliografia***

- Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*. 2008 Dec;9(12):947-57. doi: 10.1038/nrn2513.
- Pelloux Y; Costentin J; Duterte-Boucher D (2004) Differential effects of novelty exposure on place preference conditioning to amphetamine and its oral consumption. *Psychopharmacology*, , 171, 277-285.<http://dx.doi.org/10.1007/s00213-003-1584-x>
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. Aug;14(3):149-67.
- Perrin JS, Leonard G, Perron M, Pike GB, Pitiot A, Richer L, Veillette S, Pausova Z, Paus T (2009) Sex differences in the growth of white matter during adolescence. *Neuroimage*. May 1;45(4):1055-66. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.01.023.
- Philpot RM, Wecker L (2008) Dependence of adolescent novelty-seeking behavior on response phenotype and effects of apparatus scaling. *Behav Neurosci* 122:861–75. doi: 10.1037/0735-7044.122.4.861
- Philpot RM, Wecker L, Kirstein CL (2009) Repeated ethanol exposure during adolescence alters the developmental trajectory of dopaminergic output from the nucleus accumbens septi. *Int J Dev Neurosci*. 27:805-15. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.009
- Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245:1511-3. doi:10.1126/science.2781295



- Pichler EM, Hattwisch G, Grunze H, Muehlbacher M (2015) Safety and tolerability of anticonvulsant medication in bipolar disorder. *Expert Opin Drug Saf.*;14(11):1703-24. doi: 10.1517/14740338.2015.1088001.
- Pierce RC, Kumaresan V (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev.*;30(2):215-38.
- Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I (2014) Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* Mar;40:1-5. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.01.001.
- Rebec GV (2006) Behavioral electrophysiology of psychostimulants. *Neuropsychopharmacology.* Nov;31(11):2341-8. Epub 2006 Jul 19.
- Reboussin BA, Anthony JC (2006) Is there Epidemiological Evidence to Support the Idea that a Cocaine Dependence Syndrome Emerges Soon after Onset of Cocaine Use? *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.*;31(9):2055-2064. doi:10.1038/sj.npp.1301037.
- Reichel CM, Chan CH, Ghee SM, See RE. Sex differences in escalation of methamphetamine self-administration: cognitive and motivational consequences in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2012 Oct;223(4):371-80.
- Reis AD, Castro LA, Faria R, Laranjeira R (2008) Craving decrease with topiramate in outpatient treatment for cocaine dependence: an open label trial. *Rev Bras Psiquiatr* 30:132–135.

## ***Bibliografía***

- Rezaei F, Ghaderi E, Mardani R, Hamidi S, Hassanzadeh K (2016) Topiramate for the management of methamphetamine dependence: a pilot randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fundam Clin Pharmacol.* Jun;30(3):282-9. doi: 10.1111/fcp.12178. Epub 2016 Mar 4.
- Robinet PM, Rowlett JK; Bardo MT (1998) Individual differences in novelty-induced activity and the rewarding effects of novelty and amphetamine in rats. *Behav. Process*, 44, 1-9. [http://dx. doi.org/10.1016/S0376-6357\(98\)00022-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0376-6357(98)00022-9)
- Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction.* Jan;96(1):103-14.
- Roceanu A, Antochi F, Bajenaru O (2014) Chronic migraine - new treatment options. *Maedica (Buchar).* Dec;9(4):401-4.
- Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Li TK, Murphy JM, McBride WJ. Cocaine is self-administered into the shell but not the core of the nucleus accumbens of Wistar rats. *J Pharmacol Exp Ther.* Dec;303(3):1216-26. doi:10.1124/jpet.102.038950
- Rodríguez-Arias M, Aguilar MA (2012) Polydrug Use in Adolescence. *Addictions - From Pathophysiology to Treatment.* doi:10.5772/47961
- Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Simon VM (2005). Drugs of abuse and aggression: a review in animal models. *Curr Top Pharmacol* 9:1–27.
- Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Pinazo J, Simón VM (1998) Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur Neuropsychopharm* 8:95-103. doi: 10.1016/S0924-977X(97)00051-5

- Rodríguez-Arias M, Roger-Sánchez C, Vilanova I, Revert N, Manzanedo C, Miñarro J, Aguilar MA (2016) Effects of Cannabinoid Exposure during Adolescence on the Conditioned Rewarding Effects of WIN 55212-2 and Cocaine in Mice: Influence of the Novelty-Seeking Trait. *Neural Plast.*;2016:6481862. doi: 10.1155/2016/6481862
- Rodríguez-Arias M, Vaccaro S, Arenas MC, Aguilar MA, Miñarro J (2015) The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of adolescent MDMA exposure. *Physiol Behav.* Mar 15;141:190-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.01.023
- Roth ME, Carroll ME (2004) Sex differences in the escalation of intravenous cocaine intake following long- or short-access to cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav.* Jun;78(2):199-207.
- Roth ME, Carroll ME (2004) Sex differences in the escalation of intravenous cocaine intake following long- or short-access to cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav.* Jun;78(2):199-207.
- Roth ME, Cosgrove KP, Carroll ME (2004) Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev.* Oct;28(6):533-46
- Ruglass LM, Lopez-Castro T, Cheref S, Papini S, Hien DA (2014) At the crossroads: the intersection of substance use disorders, anxiety disorders, and posttraumatic stress disorder. *Curr Psychiatry Rep.* Nov;16(11):505. doi: 10.1007/s11920-014-0505-5.

## ***Bibliografia***

- Russo SJ, Jenab S, Fabian SJ, Festa ED, Kemen LM, Quinones-Jenab V (2003) Sex differences in the conditioned rewarding effects of cocaine. *Brain Res.*; 970:214–220.
- Sanchis-Segura C, Becker JB (2016) Why we should consider sex (and study sex differences) in addiction research. *Addict Biol. Sep*;21(5):995-1006. doi: 10.1111/adb.12382. Epub 2016 Mar 31.
- Schmitz JM, Lindsay JA, Stotts AL, Green CE, Moeller FG (2010) Contingency management and levodopa-carbidopa for cocaine treatment: a comparison of three behavioral targets. *Exp Clin Psychopharmacol. Jun*;18(3):238-44. doi: 10.1037/a0019195.
- Schramm-Sapyta NL, Walker QD, Caster JM, Levin ED, Kuhn CM (2009) Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animal models. *Psychopharmacology* 206:1–21. doi: 10.1007/s00213-009-1585-5
- Schroeder JP, Cooper DA, Schank JR, Lyle MA, Gaval-Cruz M, Ogbonmwan YE, Pozdeyev N, Freeman KG, Iuvone PM, Edwards GL, Holmes PV, Weinschenker D (2010) Disulfiram attenuates drug-primed reinstatement of cocaine seeking via inhibition of dopamine  $\beta$ -hydroxylase. *Neuropsychopharmacology. Nov*;35(12):2440-9. doi: 10.1038/npp.2010.127.
- Schultz W (2011) Potential vulnerabilities of neuronal reward, risk, and decision mechanisms to addictive drugs. *Neuron. Feb* 24;69(4):603-17. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.014.

- Secades-Villa R, Garcia-Rodríguez O, Jin CJ, Wang S, Blanco C (2015) Probability and predictors of the cannabis gateway effect: a national study. *Int J Drug Policy*. Feb;26(2):135-42. doi: 10.1016/j.drugpo.2014.07.011.
- See RE (2005) Neural substrates of cocaine-cue associations that trigger relapse. *European Journal Pharmacology*, 526 (1-3), 140-146.
- Segalowitz SJ, Santesso DL, Jetha MK (2010) Electrophysiological changes during adolescence: a review. *Brain Cogn*. Feb;72(1):86-100. doi: 10.1016/j.bandc.2009.10.003.
- Sell S.L., Scalzitti J.M., Thomas M.L., Cunningham K.A. (2000) Influence of ovarian hormones and estrous cycle on the behavioral response to cocaine in female rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 879-886
- Sell SL, Dillon AM, Cunningham KA, Thomas ML (2005) Estrous cycle influence on individual differences in the response to novelty and cocaine in female rats. *Behav Brain Res*. Jun 3;161(1):69-74.
- Shanti CM, Lucas CE (2003) Cocaine and the critical care challenge. *Critical Care Medicine*, 31(6), 1851–1859. doi:10.1097/01.ccm.0000063258.68159.71
- 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*. Aug;98(8):1137-41.
- Shelton KL, Hendrick ES, Beardsley PM (2013) Efficacy of buspirone for attenuating cocaine and methamphetamine reinstatement in rats. *Drug*

## ***Bibliografia***

Alcohol Depend. May 1;129(3):210-6. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.01.003.

Shinn AK, Greenfield SF (2010) Topiramate in the treatment of substance-related disorders: a critical review of the literature. *J Clin Psychiatry*. May;71(5):634-48. doi: 10.4088/JCP.08r04062gry.

Shorter D, Domingo CB, Kosten TR (2015) Emerging drugs for the treatment of cocaine use disorder: a review of neurobiological targets and pharmacotherapy. *Expert Opin Emerg Drugs*. Mar;20(1):15-29. doi: 10.1517/14728214.2015.985203.

Singh M, Keer D, Klimas J, Wood E, Werb D (2016) Topiramate for cocaine dependence: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Addiction*. Aug;111(8):1337-46. doi: 10.1111/add.13328.

Siniscalchi A, Bonci A, Biagio Mercuri N, Pirritano D, Squillace A, De Sarro G, Gallelli L (2015) The Role of Topiramate in the Management of Cocaine Addiction: a Possible Therapeutic Option. *Curr Neuropharmacol*;13(6):815-8.

Solowij N, Hall W, Lee N (1992) Recreational MDMA use in Sydney: a profile of 'Ecstasy' users and their experiences with the drug. *Br J Addict*. Aug;87(8):1161-72.

Somoza EC, Winship D, Gorodetzky CW, Lewis D, Ciraulo DA, Galloway GP, Segal SD, Sheehan M, Roache JD, Bickel WK, Jasinski D, Watson DW, Miller SR, Somoza P, Winhusen T (2013) A multisite, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the safety and efficacy of vigabatrin for

- treating cocaine dependence. *JAMA Psychiatry*. Jun;70(6):630-7. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.872.
- Sowell ER, Peterson BS, Thompson PM, Welcome SE, Henkenius AL, Toga AW (2003) Mapping cortical change across the human life span. *Nat Neurosci*. Mar;6(3):309-15.
- Sowell ER, Thompson PM, Tessner KD, Toga AW (2001) Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *J Neurosci*. Nov 15;21(22):8819-29.
- Sowell ER, Thompson PM, Toga AW (2004) Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist*. Aug;10(4):372-92.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 24:417-63. doi:10.1016/s0149-7634(00)00014-2
- Spear LP (2011) Adolescent Neurobehavioral Characteristics, Alcohol Sensitivities, and Intake: Setting the Stage for Alcohol Use Disorders? *Child Dev Perspect* 5:231-238. doi: 10.1111/j.1750-8606.2011.00182.x
- Spear LP (2013) Adolescent neurodevelopment. *J Adolesc Health*. Feb;52(2 Suppl 2):S7-13. doi: 10.1016/j.jadohealth.2012.05.006.
- Spear LP (2015) Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? *Physiol Behav*. Sep 1;148:122-30. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.01.027.

## ***Bibliografia***

- Spear LP, Swartzwelder HS (2014) Adolescent alcohol exposure and persistence of adolescent-typical phenotypes into adulthood: A mini-review. *Neurosci Biobehav Rev.* 45C:1-8. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.04.012
- Spear LP, Varlinskaya EI (2005) Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. *Recent Dev Alcohol.* 17:143-59 doi:10.1007/0-306-48626-1\_7
- Spear, L (2016) A Developmental Biological Perspective of Adolescent Substance Abuse. *Oxford Handbooks Online.* doi:10.1093/oxfordhb/9780199735662.013.012
- Stewart J (2000) Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *Journal of Psychiatry & Neuroscience,* 25 (2), 125-136.
- Tabakoff B, Hoffman PL (2000) Animal models in alcohol research. *Alcohol. Research Health,* 24 (2), 77-84.
- Tamnes CK, Ostby Y, Fjell AM, Westlye LT, Due-Tønnessen P, Walhovd KB (2010) Brain maturation in adolescence and young adulthood: regional age-related changes in cortical thickness and white matter volume and microstructure. *Cereb Cortex.* Mar;20(3):534-48. doi: 10.1093/cercor/bhp118.
- Tatsuta T, Kitanaka N, Kitanaka J, Morita Y, Takemura M (2007) Lack of effect of anticonvulsant topiramate on methamphetamine-induced stereotypy and rewarding property in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 87:48-55. doi:10.1016/j.pbb.2007.03.019



- Tekin I, Roskoski R Jr, Carkaci-Salli N, Vrana KE (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neural Transm* (Vienna). Dec;121(12):1451-81. doi: 10.1007/s00702-014-1238-7.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol*. May;154(2):327-42. doi: 10.1038/bjp.2008.77.
- Thomsen M, Caine SB (2007) Intravenous drug self-administration in mice: practical considerations. *Behav Genet*. Jan;37(1):101-18.
- Toga AW, Thompson PM (2003) Temporal dynamics of brain anatomy. *Annu Rev Biomed Eng*.;5:119-45
- Tzschentke TM (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56 (6), 613-672.
- Tzschentke TM (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56:613–72. doi:10.1016/S0301-0082(98)00060-4
- 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 (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*. 12: 227–462. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x

## ***Bibliografía***

Umbricht A, DeFulio A, Winstanley EL, Tompkins DA, Peirce J, Mintzer MZ, et al. (2014) Topiramate for cocaine dependence during methadone maintenance treatment: a randomized controlled trial. *Drug Alcohol Depend* 140:92-100. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.03.033.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report (2016) United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7. [http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD\\_DRUG\\_REPORT\\_2016\\_web.pdf](http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf)

Van Haaren F, Meyer ME (1991) Sex differences in locomotor activity after acute and chronic cocaine administration, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39 923.

Vetreno RP, Crews FT (2012) Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience*, 226, 475–488.

Vetreno RP, Crews FT (2015) Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers of Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fnins.2015.00035

Vidal-Infer A, Arenas MC, Daza-Losada M, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2012) High novelty-seeking predicts greater sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 102:124–132. doi: 10.1016/j.pbb.2012.03.031

Volkow ND, Wang GJ, Ma Y, Fowler JS, Zhu W, Maynard L, Telang F, Vaska P, Ding YS, Wong C, Swanson JM (2003) Expectation enhances the regional

- brain metabolic and the reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers. *J Neurosci.* Dec 10;23(36):11461-8.
- Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.*;2(2):322-8.
- Walker Q.D., J. Cabassa, A.S. Hilmar, C.M. Kuhn, (2001) Sex differences in cocaine-stimulated motor behavior: disparate effects of gonadectomy, *Neuropsychopharmacology* 25 118–130.
- Walker QD, Kuhn CM (2008) Cocaine increases stimulated dopamine release more in periadolescent than adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 30:412–418. doi: 10.1016/j.ntt.2008.04.002
- Wang HR, Woo YS, Bahk WM (2014) Anticonvulsants to treat post-traumatic stress disorder. *Hum Psychopharmacol. Sep*;29(5):427-33.
- Wingo T, Nesil T, Choi JS, Li MD (2016) Novelty Seeking and Drug Addiction in Humans and Animals: From Behavior to Molecules. *J Neuroimmune Pharmacol. Sep*;11(3):456-70. doi: 10.1007/s11481-015-9636-7.
- Wise RA (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci.*;19:319-40.
- Yahyavi-Firouz-Abadi N, See, RE (2009) Anti-relapse medications: preclinical models for drug addiction treatment. *Pharmacology Therapeutics*, 124 (2), 235-247.
- Yamamoto DJ, Nelson AM, Mandt BH, Larson GA, Rorabaugh JM, Ng CM, Barcomb KM, Richards TL, Allen RM, Zahniser NR (2013) Rats classified as low or high cocaine locomotor responders: a unique model involving

## ***Bibliografia***

striatal dopamine transporters that predicts cocaine addiction-like behaviors. *Neurosci Biobehav Rev.* Sep;37(8):1738-53. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.002.

Yap JJ, Miczek KA (2008) Stress and Rodent Models of Drug Addiction: Role of VTA-Accumbens-PFC-Amygdala Circuit. *Drug Discovery Today Disease Models*, 5 (4), 259-270.

Zakharova E, Wade D, Izenwasser S (2009) Sensitivity to cocaine conditioned reward depends on sex and age. *Pharmacol Biochem Behav.*; 92:131–134.

Zakharova E, Wade D, Izenwasser S (2009) Sensitivity to cocaine conditioned reward depends on sex and age. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 131–134.

Zalewska-Kaszubska J, Bajer B, Gorska D, Andrzejczak D, Dyr W, Bieńkowski P (2013) Effect of repeated treatment with topiramate on voluntary alcohol intake and beta-endorphin plasma level in Warsaw alcohol high-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*. Jan;225(2):275-81. doi: 10.1007/s00213-012-2812-z. Epub 2012 Jul 31.

Zaru A, Maccioni P, Colombo G, Gessa GL (2013) The dopamine  $\beta$ -hydroxylase inhibitor, nepicastat, suppresses chocolate self-administration and reinstatement of chocolate seeking in rats. *Br J Nutr.* Oct;110(8):1524-33. doi: 10.1017/S0007114513000743.

Zeigler DW, Wang CC, Yoast RA, Dickinson BD, McCaffree MA, Robinowitz CB, Sterling ML; Council on Scientific Affairs, American Medical Association (2005) The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. *Prev Med.* Jan;40(1):23-32.

Zhou Y, Zhao M, Zhou C, Li R (2016) Sex differences in drug addiction and response to exercise intervention: From human to animal studies. *Front Neuroendocrinol.* Jan;40:24-41. doi: 10.1016/j.yfrne.2015.07.001.

Zuckerman, M., Kuhlman, D. (2000). Personality and Risk-Taking: common biosocial factors. *Journal of Personality*, 68, 999–1017. doi:10.1111/1467-6494.00124

Zukerman, M. (1979) *Sensation seeking: Beyond the optimal level of arousal.* Hillsdale, NJ: Erlbaum..