



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



**Efectos de la Palmitoiletanolamida en la
adicción a cocaína: influencia en la
sensibilización conductual y en el
condicionamiento preferencial de lugar.**

Memoria de Tesis presentada por D^a EMMA NOELIA ZAMBRANA INFANTES

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga


Málaga 2016





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Emma Noelia Zambrana Infantes

 <http://orcid.org/0000-0002-8299-068X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



D. LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ, Doctor en Psicología y Catedrático de Psicobiología del Depto. de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, y D. EDUARDO BLANCO CALVO, Doctor en Psicología y Profesor Contratado Doctor del Depto. de Pedagogía y Psicología de la Universidad de LLeida., como directores

CERTIFICAN:

Que, D^a. EMMA NOELIA ZAMBRANA INFANTES ha realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología y en la Unidad de Microscopía y Laboratorio de Investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga, bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado: *“Efectos de la Palmitoiletanolamida en la adicción a cocaína: influencia en la sensibilización conductual y en el condicionamiento preferencial de lugar”*, y que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, considerando que reúne el rigor científico y las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 22 de septiembre de 2016.



Fdo.- Luis Javier Santín Núñez



Fdo.- Eduardo Blanco Calvo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Yo, Emma Noelia Zambrana Infantes, DECLARO que soy autora del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología de la Universidad de Málaga y en la Unidad de Microscopía y Laboratorio de Investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga, bajo la dirección del Dr. Luis Javier Santín Núñez y el Dr. Eduardo Blanco Calvo.

Y para que así conste, firmo la presente declaración en Málaga, a 22 de septiembre de 2016.



Fdo. Emma Noelia Zambrana Infantes



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo se ha realizado al amparo del grupo de investigación del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo; Junta de Andalucía), código CTS643, Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta, y establecido en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) con la participación conjunta del Hospital Universitario Regional de Málaga y la Universidad de Málaga.

El trabajo se ha realizado en las siguientes instalaciones de la Universidad de Málaga:

- Depto. de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga.
- ECAI Centro de Experimentación Animal, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga.

El trabajo ha sido financiado por:

- Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU, AP2010-2044). Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia.
- Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Gobierno de España. (PSI2013-44901). Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez/Carmen Pedraza Benítez (co-IP). Título: Neurogénesis hipocampal adulta en la extinción de la preferencia de lugar inducida por cocaína: papel del ácido lisofosfatídico y su receptor LPA1. Fecha de inicio y fin: 01/01/2014 - 01/01/2017. Cuantía: 78.650 EUR
- Ministerio de Ciencia e Innovación (MCCI), Gobierno de España. (PSI2010-16160). Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez. Título: Beneficios del enriquecimiento ambiental en las alteraciones cognitivas y emocionales inducidas

por estrés crónico: Papel del receptor LPA₁ y de la neurogénesis hipocampal.

Fecha de inicio y fin: 01/01/2011 - 01/01/2014. Cuantía: 121.000 EUR

Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo. Junta de Andalucía.

- Incentivos a grupos de investigación no universitarios. Grupo PAIDI del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación, código CTS643, Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hospital Universitario Regional de Málaga



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE IGUALDAD,
SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

MINISTERIO
DE EDUCACIÓN, CULTURA
Y DEPORTE





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi hijo





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

La adicción a cocaína supone un problema, tanto a nivel individual como social, puesto que conlleva numerosas complicaciones sanitarias para los consumidores e importantes costes económicos para el sistema de salud. La naturaleza crónica de la adicción a psicoestimulantes, como la cocaína, genera a largo plazo procesos de dependencia y constantes recaídas. Actualmente, las alternativas terapéuticas empleadas para el tratamiento de la adicción a cocaína no son capaces de prevenir la recaída de manera efectiva, por lo que es necesaria la búsqueda de tratamientos eficaces para este trastorno por consumo de estimulantes.

En este sentido, cada vez son más los estudios que demuestran la participación de las aciletanolamidas en la regulación de la conducta adictiva a distintas drogas de abuso. En cuanto a la adicción a cocaína, estudios recientes demuestran la capacidad de la oleiletanolamida para bloquear la expresión de respuestas asociadas a la búsqueda y condicionamientos inducidos tras la administración repetida de cocaína. En cambio, no existen estudios que comprueben el efecto de la palmitoiletanolamida (PEA) en procesos conductuales relacionados con la adicción a esta droga de abuso. En esta tesis doctoral, nos hemos planteado estudiar el efecto de la administración periférica de PEA sobre la adquisición y/o expresión de la locomoción condicionada y sensibilización conductual (segundo bloque experimental), así como sobre la adquisición y/o expresión del condicionamiento de lugar preferencial inducidas por cocaína (tercer bloque experimental). Además, se analizó el posible grado de afectación neurológica y exploratoria relacionada con la administración aguda de PEA (primer bloque experimental).

Los resultados demostraron que la administración aguda de PEA a dosis intermedia/alta (1/10 mg/kg) no producen alteraciones de los reflejos sensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora, ni interfiere en el patrón exploratorio normal; aunque la dosis más alta produce una reducción significativa de la actividad locomotora. En cuanto a los procesos relacionados con la adicción a cocaína, la administración repetida de PEA a ambas dosis fue capaz de bloquear la adquisición de la locomoción condicionada y de la sensibilización conductual, mientras que la administración aguda de la dosis alta de PEA redujo la expresión de la locomoción

condicionada, y tanto la dosis intermedia como la alta bloquearon la expresión de la sensibilización conductual. Por último, la administración repetida de PEA no interfirió en la adquisición del condicionamiento de lugar preferencial; en cambio, la administración aguda de PEA a ambas dosis bloqueó la expresión de la respuesta de condicionamiento de lugar preferencial inducida por cocaína.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la PEA participa tanto en la adquisición como en la expresión de la adicción a cocaína. En cambio, se necesitan más estudios que permitan conocer los mecanismos de acción por los cuales se producen estos efectos terapéuticos y poder evaluar el beneficio potencial de los efectos de la PEA en la adicción a cocaína.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de una tesis doctoral requiere de una enorme dedicación y, cómo no, de la colaboración y trabajo de muchas personas. Es por ello que quiera agradecer a todos aquellos que aportaron su granito de arena para poder llevar a cabo este estudio. En primer lugar a mi director *Luis*, por todos estos años que ha estado conmigo ayudándome y apoyándome en todos los aspectos tanto a nivel laboral como personal, por tener un gran corazón y por confiar en mí hasta el último momento. Hay momentos difíciles en los que uno piensa en abandonar, en coger el camino fácil, pero saber que hay alguien que ha apostado por ti y que lo sigue haciendo, es fundamental para conseguir la motivación que te permita seguir hasta el final.

Edu, como director y compañero, tengo que agradecerte la implicación que has tenido en todo momento durante estos años de trabajo, y la paciencia con la que me has enseñado todo lo que sabes de este gigantesco mundo de la investigación sobre adicciones a drogas.

Gracias *Carmen* por ayudarme siempre que necesité de tus conocimientos, y *Guillermo*, aunque apenas nos veamos sé que cuento contigo y que eres una gran persona.

A todos mis compañeros de trabajo por todos estos años compartidos con vosotros, sois geniales. *Estela*, desde mis comienzos estuviste conmigo para enseñarme y ayudarme siempre que he tenido cualquier duda. *Román*, tú ya lo sabes, me encanta que seas mi “compi de fatigas”, que estés todos los días a mi lado en el laboratorio para contarte mis penas y alegrías, que siempre me saques una sonrisa cuando menos me lo espero. Gracias por todo y por estar siempre dispuesto a ayudar, eres una gran persona y llegarás muy lejos siendo así. *David*, llegaste en un buen momento, cuando más trabajo acumulado tenía... sin tu ayuda me hubiera vuelto loca y a saber qué más, muchas gracias por querer aprender y trabajar con tanta dedicación. *Juani*, aunque me distraigas todos los días con tus “aventuritas” sabes que en el fondo me gusta y me sirve para desconectar un poco. *Sara*, nuestra relación como compañeras ha sido corta pero intensa, parece que te conozco desde siempre y estos meses seguro que serán el comienzo de una gran amistad.

Ay mi *Cristina*, a ti te dedico un párrafo por no dedicarte un libro. Te quiero en el alma, ya lo sabes. Como compañera eres fantástica, pero como amiga y como persona no hay palabras que describan como eres. Siempre me has escuchado, comprendido, ayudado y apoyado en todo, no sabes lo feliz que me hace saber que te tengo en mi vida. He pasado buenos y malos momentos y nunca me faltaste... Gracias mi niña.

Qué puedo decir de mis amigas, que valéis millones. Mi *Sandrita*, mi “hermana”, eres tan feliz, tan alegre, tan AMIGA, tan buena persona que no te cabe el corazón en el pecho. Piensas por mí cuando mi cabeza no da para nada más y siempre sabes indicarme el mejor camino a tomar ya que me conoces mejor que nadie, incluso mejor de lo que me conozco yo a mí misma. Solo con una mirada somos capaces de hablar. Mi *Leti*, veinticinco años de amistad dan para mucho, hemos crecido juntas. *Maria*, mi psicóloga personal, con tu sonrisa y con tu abrazo siempre consigues que se me olviden las penas. *Estefi* y *Tania*, os tengo lejos pero os tengo, es lo que importa. Ya sabéis todas lo que valéis para mí y lo que os quiero así que no tengo que deciros mucho más, sois las mejores amigas que se puedan tener. Y *Borjita*, a ti también te dedico unas palabras ya que siempre me has dedicado un hueco en tu vida, somos amigos desde hace muchos años y nunca me has faltado.

A *mis padres*, que me han criado, me han acompañado siempre y me han ayudado en todo momento, gracias. Sé que os sentís orgullosos de mí, pero no estaría donde estoy si no hubiera sido por vosotros. Os quiero.

Iván, tú has compartido conmigo todos estos años de duro trabajo. Muchas gracias por darme el regalo más maravilloso que puedo tener.

He querido dejar en último lugar a la personita que mueve mi mundo. Mi bebé, *David*, todo este trabajo y toda mi vida te la dedico a ti porque eres lo que más quiero del mundo entero, porque el amor que se siente por un hijo no se siente por nada ni por nadie más. Eres mi alegría, lo que me motiva a seguir mirando hacia adelante cada día. Tu sonrisa de traviesillo, tus abrazos de alegría cuando me ves llegar a casa, esa energía que tienes, es lo que me hace feliz y tenerte a mi lado es lo único que necesito en mi vida. Quiero darte lo mejor de mí, que seas el niño más feliz y que te sientas orgulloso de tener la madre que tienes. Espero que cuando seas mayorcito leas este párrafo y te emociones como yo lo estoy haciendo ahora. Te quiero mi vida, mi tesoro.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción

1. ¿QUÉ ES LA ADICCIÓN? USO, ABUSO Y ADICCIÓN	3
2. LA ADICCIÓN COMO TRASTORNO DE CONTROL DE IMPULSO Y TRASTORNO COMPULSIVO	5
3. LA ADICCIÓN COMO UN PROCESO DE APRENDIZAJE DESADAPTATIVO	10
4. MODELOS ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DE LA ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO	12
4.1.Sensibilización de los efectos locomotores inducidos por las drogas	12
4.2.Condicionamiento clásico: condicionamiento de lugar preferente	14
4.3.Condicionamiento operante o instrumental: autoadministración intravenosa	17
5. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN	21
5.1.Neurocircuito de los efectos reforzantes de las drogas de abuso	21
5.2.Circuitos implicados en la recaída	23
5.3.Circuitos implicados en la búsqueda compulsiva de la droga	25
5.4.Otros circuitos cerebrales implicados en el proceso adictivo	26
6. LA COCAÍNA	28
6.1.Datos epidemiológicos e importancia de su estudio	28
6.2.La cocaína y sus formas de consumo	31
6.3.Mecanismo de acción de la cocaína	33
6.4.Cocaína y sensibilización conductual (SC)	36
6.5.Contexto, cocaína e hipocampo	39
7. LAS N-ACILETANOLAMINAS (NAEs)	42
7.1.Biosíntesis y degradación de las NAEs	42
7.2.Receptores	44
7.3.Efectos producidos por PEA	45
Capítulo II: Hipótesis y objetivos	51
Capítulo III: Procedimientos generales	57

1. Animales de experimentación	59
2. Aspectos éticos	60
3. Sala de experimentación	60
4. Pruebas de comportamiento	61
4.1. Evaluaciones neurológicas	61
4.2. Laberinto de hoyos (<i>HB</i>)	63
4.3. Laberinto Elevado en Cruz (<i>EPM</i>)	64
4.4. Campo abierto (<i>OF</i>)	66
4.5. Condicionamiento de Lugar Preferencial (<i>CLP</i>)	67
5. Análisis estadísticos	68
6. Tratamientos	68

Capítulo IV: Efecto de la palmitoiletanolamida en la actividad exploratoria y en las pruebas neurológicas en ausencia de cocaína

1. Introducción	73
2. Material y métodos	74
2.1. Procedimiento conductual	74
2.2. Análisis estadísticos	75
3. Resultados	76
3.1. Efecto del tratamiento agudo de PEA en el laberinto de hoyos	76
3.2. Efecto del tratamiento agudo de PEA en el laberinto elevado en cruz	79
3.3. Efecto del tratamiento agudo de PEA en las pruebas neurológicas	80

Capítulo V: Efecto de la palmitoiletanolamida en la locomoción condicionada (LC) y la sensibilización conductual (SC) inducida por cocaína

- Introducción	87
Experimento 1: Efecto de la administración repetida de PEA en la adquisición de la LC y SC inducida por cocaína	88
1. Material y métodos	88
1.1. Protocolo de LC y SC inducida por cocaína con administración repetida de PEA durante el condicionamiento	88



1.2.Análisis estadísticos	89
2. Resultados	90
2.1.Locomoción libre de droga en animales tratados con vehículo, PEA 1 mg/kg y PEA 10 mg/kg	90
2.2.Efecto del tratamiento repetido de PEA durante el condicionamiento	90
2.3.Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición de la LC inducida por cocaína	91
2.4.Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición de la SC inducida por cocaína	92
Experimento 2: Efecto de la administración aguda de PEA en la expresión de la LC y SC inducida por cocaína	94
1. Material y métodos	94
1.1.Protocolo de LC y SC inducida por cocaína con administración aguda de PEA	94
1.2.Análisis estadísticos	95
2. Resultados	96
2.1.Efecto del tratamiento con cocaína durante las sesiones de condicionamiento	96
2.2.Efecto del tratamiento agudo de PEA en la expresión de la LC inducida por cocaína	97
2.3.Efecto del tratamiento agudo de PEA en la SC inducida por cocaína	98
Capítulo VI: Efecto de la palmitoiletanolamida en el condicionamiento de lugar preferencial (CLP)	101
- Introducción	103
Experimento 1: Efecto de la PEA sobre la adquisición del condicionamiento de lugar preferencial	104
1. Material y métodos	104
1.1.Protocolo de CLP con administración repetida de PEA durante el condicionamiento	104
1.2.Análisis estadísticos	105

2. Resultados	106
2.1.Efecto del tratamiento repetido de PEA en la locomoción inducida por cocaína durante la fase de condicionamiento	106
2.2.Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición del CLP inducido por cocaína	107
2.3.Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición de la LC inducida por cocaína.	108
 Experimento 2: Efecto de la PEA sobre el recuerdo del condicionamiento de lugar preferencial	 111
1. Material y métodos	111
1.1.Protocolo de CLP con administración aguda de PEA	111
1.2.Análisis estadísticos	112
2. Resultados	113
2.1.Efecto del tratamiento con cocaína durante la fase de condicionamiento, así como en la adquisición del CLP y en la LC en el Test 1	113
2.2.Efecto del tratamiento agudo de PEA en el recuerdo del CLP y en la locomoción en el Test 2	115
 Capítulo VII: Discusión	 121
- Efecto de la PEA en la actividad exploratoria y en las pruebas neurológicas en ausencia de cocaína	123
- Efecto de la PEA en la LC y en la SC inducida por cocaína	127
- Efecto de la PEA en el CLP inducido por cocaína	130
 Capítulo VIII: Conclusiones	 139
 Referencias Bibliográficas	 143

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I: Introducción

Figura 1. Diagrama de los estadios de los ciclos del trastorno de control de impulsos y del trastorno compulsivo.	6
Figura 2. Ciclo de la adicción.	7
Figura 3. Proceso de aprendizaje implicado en la adicción a drogas de abuso.	10
Figura 4. Procedimiento general del CLP.	15
Figura 5. Ejemplo de una caja de condicionamiento operante.	20
Figura 6. Sistema implicado en la adicción a drogas de abuso.	22
Figura 7. Prevalencia del consumo de cocaína en el año 2014.	29
Figura 8. Circuito implicado en la expresión de la sensibilización conductual inducida por cocaína.	38
Figura 9. El hipocampo en el circuito de la adicción.	40
Figura 10. Vías de síntesis de las N-Aciletanolaminas.	43
Figura 11. Estructura química de la molécula de PEA y de su molécula precursora.	44

Capítulo III: Procedimientos generales

Figura 12. Condiciones de estabulación de los animales de experimentación.	59
Figura 13. Pruebas neurológicas empleadas para evaluar la integridad de respuesta de los sistemas sensoriales y motores.	62
Figura 14. Imagen del laberinto de hoyos empleado en nuestro estudio.	63
Figura 15. Imagen del laberinto elevado en cruz utilizado en nuestros estudios.	65
Figura 16. Imagen del campo abierto empleado en nuestros experimentos.	66

Figura 17. Imagen de las cajas de condicionamiento de lugar preferencial empleadas en nuestros estudios. 68

Capítulo IV: Efecto de la palmitoiletanolamida en la actividad exploratoria y en las pruebas neurológicas en ausencia de cocaína

- Resultados

Figura 18. Frecuencia de exploración de hoyos en la periferia y en el centro del laberinto de hoyos. 76

Figura 19. Frecuencia de exploración vertical en el laberinto de hoyos. 77

Figura 20. Distancia recorrida en el laberinto de hoyos. 78

Capítulo V: Efecto de la palmitoiletanolamida en la locomoción condicionada (LC) y la sensibilización conductual (SC) inducida por cocaína

-Experimento 1: Efecto de la administración repetida de PEA en la adquisición de la LC y SC inducida por cocaína

- Material y métodos

Figura 21. Esquema de las fases en el proceso de sensibilización a cocaína. 89

- Resultados

Figura 22. Locomoción basal tras la administración aguda de vehículo, PEA 1 o PEA 10 mg/kg. 90

Figura 23. Locomoción durante la fase de condicionamiento a cocaína. 91

Figura 24. Locomoción condicionada inducida por cocaína. 92

Figura 25. Sensibilización condicionada inducida por cocaína. 93

-Experimento 2: Efecto de la administración aguda de PEA en la expresión de la LC y SC inducida por cocaína

- Material y métodos

Figura 26. Esquema de las fases en el proceso de sensibilización a cocaína. 94

- Resultados

Figura 27. Locomoción durante la fase de condicionamiento. 96

Figura 28. Locomoción condicionada inducida por cocaína. 97

Figura 29. Sensibilización condicionada inducida por cocaína. 98

Capítulo VI: Efecto de la palmitoiletanolamida en el condicionamiento de lugar preferencial (CLP)

-Experimento 1: Efecto de la PEA sobre la adquisición del condicionamiento de lugar preferencial

- Material y métodos

Figura 30. Esquema que representa las tres fases del condicionamiento de lugar preferente. 105

- Resultados

Figura 31. Distancia recorrida durante la fase de Condicionamiento. 107

Figura 32. Puntuación de CLP inducido por cocaína. 108

Figura 33. Distancia recorrida en el compartimento CS+ y CS- y tasa de cambio de la distancia recorrida en el compartimento C+. 109

- Experimento 2: Efecto de la PEA sobre el recuerdo del condicionamiento de lugar preferencial

- Material y métodos

Figura 34. Esquema de las fases en el proceso de CLP con administración aguda de PEA en el Test 2 de preferencia de lugar inducida por cocaína. 111

- Resultados

Figura 35. Condicionamiento de lugar preferencial y locomoción condicionada antes de la administración de los tratamientos.	114
Figura 36. Puntuación de CLP inducido por cocaína.	116
Figura 37. Locomoción por compartimentos y tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ en el Test2 de CLP inducido por cocaína.	118

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I: Introducción

Tabla 1. Definiciones de los términos más empleados en adicción a drogas de abuso.	9
Tabla 2. Definiciones de los términos utilizados en el condicionamiento clásico y el condicionamiento instrumental.	18
Tabla 3. Resumen de las diferentes estructuras que participan en la adicción a drogas de abuso y su implicación funcional.	27
Tabla 4. Formas de abuso de la cocaína.	32
Tabla 5. Principales efectos mediados por OEA y PEA, así como los receptores implicados en cada proceso.	46

Capítulo IV: Efecto de la palmitoiletanolamida en la actividad exploratoria y en las pruebas neurológicas en ausencia de cocaína

- Resultados

Tabla 6. Evaluación conductual en el laberinto elevado en cruz en los distintos grupos experimentales.	80
Tabla 7. Exploración neurológica de los animales tratados con vehículo, PEA 1 o PEA 10 mg/kg a los 5 min. de la administración de los distintos tratamientos.	81
Tabla 8. Exploración neurológica de los animales tratados con vehículo, PEA 1 o PEA 10 mg/kg a los 30 min. de la administración de los distintos tratamientos.	82

ABREVIATURAS

ACe: Amígdala central

AEA: Araquidoniletanolamida (anandamida)

ATV: Área Tegmental Ventral

BLA: Amígdala basolateral (del inglés *Basolateral Amygdala*)

BSNT: Núcleo cama de la estria terminal (del inglés *Bed Nucleus of the Stria Terminalis*)

CB1: Receptor cannabinoide tipo 1

CB2: Receptor cannabinoide tipo 2

CLP: Condicionamiento de Lugar Preferencial

COF: Corteza orbitofrontal

CPF: Corteza Prefrontal

CPL: Corteza Prelímbica

CRF: Hormona estimulante de corticotropina (del inglés *Corticotropin Releasing Factor*)

CS+: Estímulo condicionado positivo (del inglés *Positive Conditioned Stimulus*)

CS-: Estímulo condicionado neutro (del inglés *Neutral Conditioned Stimulus*)

DA: Dopamina

EC: Estímulo Condicionado

EI: Estímulo Incondicionado

FAAH: Amida hidrolasa de ácidos grasos

FR: Programa de razón fija (del inglés *Fixed Ratio*)

GDE1: Glicerofosfodiesterasa-1

GDE4: Glicerofosfodiesterasa-4

Glu: Glutamato

GP-NAEs: Glicerofosfo- N-Aciletanolaminas

GPR: Receptor huérfano acoplado a proteína G

Hip: Hipocampo

HL: Hipotálamo lateral

HPA: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal

ICSS: Técnica de autoestimulación intracraneal (del inglés *Intracranial Self Stimulation*)

LC: Locomoción Condicionada

Liso-NAPE: Liso-N-acilfosfatidiletanolamina

Liso-PLD: Lisofosfolipasa D

NA: Noradrenalina

NAAA: N-aciletanolamina hidrolizante *ácido amidasa*

NAcc: Núcleo Accumbens

NAEs: N-Aciletanolaminas

NAPE: N-acilfosfatidiletanolamina

NAPE-PLD: Fosfolipasa D específica de N-acilfosfatidiletanolamina (del inglés *phospholipase D*)

NAT Ca²⁺: N-aciltransferasa dependiente de calcio

N-palmitoil-PE: N-palmitoil-fosfatidiletanolamina

OEA: Oleiletanolamida

OMS: Organización Mundial de la Salud

PR: Programa de razón progresiva (del inglés *Progressive Ratio*)

PC: Fosfatidilcolina (del inglés *phosphatidylcholine*)

PE: Fosfatidiletanolamina

PEA: Palmitoiletanolamida

PLC: Fosfolipasa-C

PLP: Potencial a largo plazo

PLP A₂: Fosfolipasa A₂

PPAR α : Receptor nuclear proliferador de peroxisoma alpha

PPAR γ : Receptor nuclear proliferador de peroxisoma gamma

PV: Pálido Ventral

RC: Respuesta Condicionada

RI: Respuesta Incondicionada

SC: Sensibilización Conductual

SNc: Sustancia negra *pars compacta*

TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (del inglés *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*)

$\alpha\beta$ H4: $\alpha\beta$ Hidrolasa-4

5-HT: Serotonina



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo I:

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. ¿QUÉ ES LA ADICCIÓN? USO, ABUSO Y ADICCIÓN

Se entiende por adicción el uso repetido de una sustancia y/o la realización de una conducta de forma compulsiva para obtener un refuerzo inmediato, pero que a largo plazo provoca daños y un deterioro significativo en el desenvolvimiento social. Tal y como explica Griffiths “cualquier actividad gratificante puede ser contemplada como potencialmente adictiva, pero sólo aquellas socialmente desaprobadas por su riesgo asociado son calificadas como adicción, en lugar de como meros hábitos, en el momento actual. Éste es un argumento poderoso para comprender mejor el concepto de adicción” (Griffiths, 2008). Por lo tanto, cualquier actividad puede llegar a desarrollar una adicción y dependerá del juicio social en un momento determinado para considerarla como tal (Ruiz Sánchez de León, 2014). Actividades tales como las compras, el uso de videojuegos o internet, el juego o el sexo, en las que el elemento reforzante va implícito en la propia conducta, favorece su repetición y automatización y pueden desembocar en una obsesión, en una ejecución descontrolada y compulsiva que llegue a cumplir con los criterios de adicción (Adès y Lejoyeux, 2003; Ruiz Sánchez de León, 2014). Dado que el campo de las adicciones es bastante amplio nosotros nos centraremos en la dependencia inducida por drogas de abuso.

Las sustancias adictivas poseen gran potencial reforzante (inducen estados placenteros como la euforia, reducen el dolor o el estrés, etc.), y el uso de drogas con el objetivo de experimentar estas sensaciones no es necesariamente perjudicial para el individuo o la sociedad (Torregrossa, Corlett y Taylor, 2011). En un primer momento, por lo tanto, se produce una fase de inicio del **uso** de la droga que se lleva a cabo de forma recreativa y excepcional donde la persona es capaz de interrumpir el consumo de forma voluntaria. En esta fase se experimentan los efectos placenteros de la sustancia y se activa el sistema de recompensa cerebral o circuito de refuerzo (Ruiz Sánchez de León, 2014).

Es muy probable que el uso repetido de la droga lleve a una fase de **abuso**, en la cual se da un consumo recurrente de la sustancia a pesar de producir efectos adversos a nivel personal, social o laboral. En esta fase empiezan a producirse diversas neuroadaptaciones en cerebros vulnerables (Nestler, 2013) que se mantendrán a largo plazo y si superan un punto crítico o de transición van a concluir en el desarrollo de una **adicción** (Nestler, 2013; Ruiz Sánchez de León, 2014). De hecho, en la fase de

dependencia, el consumo se vuelve crónico y descontrolado a pesar de las consecuencias negativas que conlleva y se produce un abandono de las actividades normales (Cleva y Gass, 2010; García-Fernández et al., 2012; Torregrossa et al., 2011).

En 1969, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió la dependencia a las drogas como un “estado psicológico a veces físico (derivado del consumo de una droga), caracterizado por respuestas conductuales con un alto grado de compulsividad con el fin de poder experimentar sus efectos psíquicos y, en ocasiones, para evitar las consecuencias negativas que provoca su ausencia” (Guillazo-Blanch et al., 2007).

Según Milton y Everitt (2012a), el término **adicción** se considera sinónimo del de **dependencia de sustancias** empleado en los principales sistemas de clasificación de trastornos mentales, los cuales son, el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, cuarta edición, texto revisado (DSM-IV-TR) de la *American Psychiatric Association* (American Psychiatric Association, 2002) y la Clasificación Internacional de Enfermedades, décima edición (CIE-10) de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1994). En la última edición de los criterios diagnósticos de la APA (DSM-5) los trastornos por dependencia de sustancias ahora se clasifican como Trastornos por consumo de sustancias, aunque sigue evitándose el término de adicción por las connotaciones negativas que puede llevar consigo (American Psychiatric Association, 2013).

En cualquier caso, la drogadicción constituye un trastorno crónico y recidivante caracterizado por un patrón conductual compulsivo de búsqueda y consumo de drogas (Koob y Volkow, 2010), de forma que el individuo pierde el control sobre el consumo (Goodman, 2008; Myers y Carlezon, 2010; Nestler, 2013; Panlilio et al., 2005), que persiste a pesar de las notables consecuencias negativas que conlleva (Camí y Farré, 2003; Goodman, 2008; Weiss et al., 2001).

2. LA ADICCIÓN COMO TRASTORNO DE CONTROL DE IMPULSO Y TRASTORNO COMPULSIVO

Goodman (2008) define la adicción empleando dos características necesarias y suficientes para poder distinguirla del uso de la droga: “la adicción es una condición en la que un comportamiento que puede servir tanto para producir placer y para reducir afectos dolorosos, se emplea en un patrón que se caracteriza por dos rasgos fundamentales: 1) el fracaso recurrente para controlar el comportamiento, y 2) la continuación de la conducta a pesar de las significativas consecuencias nocivas”.

En este contexto, la adicción implica una pérdida de control de impulsos y comportamientos compulsivos (Goodman, 2008; Koob, 2013) (Figura 1). Los trastornos de control de impulso, como por ejemplo la piromanía, se caracterizan por una marcada tensión o excitación afectiva antes de realizar la conducta y por un gran alivio, placer o gratificación una vez realizada la conducta (en el caso de la piromanía, provocar incendios sería la conducta que produce placer) (American Psychiatric Association, 2013). Estos comportamientos impulsivos, por lo tanto, son motivados y mantenidos por un reforzamiento positivo (Goodman, 2008; Koob, 2013), ya que las consecuencias que se obtienen al realizar la conducta van a ser gratificantes y placenteras, incrementando así la probabilidad de que vuelva a darse en un futuro.

En el campo de la drogodependencia, la impulsividad es un importante factor de riesgo en la transición de un uso casual de la droga a la propia dependencia; donde la droga es usada para conseguir refuerzo inmediato a pesar de sus evidentes consecuencias negativas (Bechara et al., 2001; Grant, 2000). En cambio, el objetivo de los comportamientos compulsivos es prevenir o disminuir la ansiedad, o evitar alguna situación temida, aunque estos actos no están conectados de forma realista con aquello que se pretende prevenir (American Psychiatric Association, 2013). Por lo tanto, la conducta compulsiva es sostenida por un reforzamiento negativo, esto es, que la realización de la conducta elimina o reduce un estímulo aversivo (el malestar o la ansiedad previa) (Goodman, 2008; Koob, 2013).

De esta forma, podemos comprender cómo la conducta adictiva se ve mantenida por ambos procesos de reforzamiento positivo y negativo: por un lado, el consumo de droga se produce para inducir los efectos placenteros que la droga provoca y, por otro

lado, la droga se consume para reducir estados emocionales aversivos, lo que Koob (2013) define como el “lado oscuro” de la adicción.

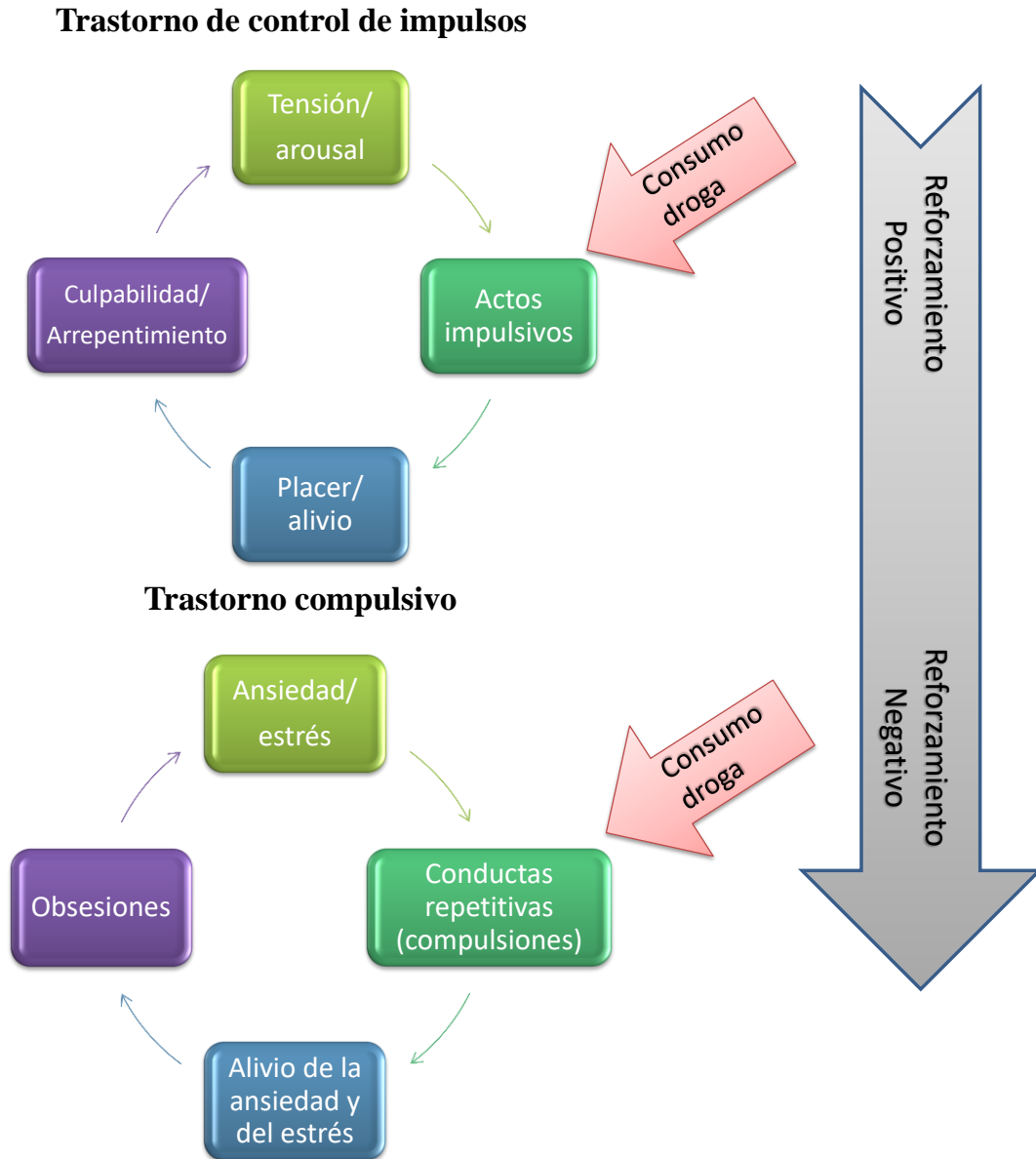


Figura 1. Diagrama de los estadios de los ciclos del trastorno de control de impulsos y del trastorno compulsivo (Modificado de Koob et al., 2004). En los trastornos de control de impulso se produce un incremento de tensión previo al acto impulsivo, el cual conlleva un efecto placentero o gratificante, por lo que la conducta se ve mantenida por un reforzamiento positivo. La ejecución de estos actos puede o no producir sentimiento de culpabilidad. En los trastornos compulsivos existen pensamientos recurrentes y persistentes (obsesiones) que generan estrés y ansiedad. La persona realiza conductas repetitivas (compulsiones) necesarias para que esta ansiedad disminuya, por lo que este tipo de conductas están mantenidas por un reforzamiento negativo.

La adicción a drogas se ha conceptualizado como un desorden que progresa desde la impulsividad a la compulsividad en un ciclo que consta de tres estadios: **atracción** (*binge*)/**intoxicación**, **abstinencia** (*withdrawal*)/**afecto negativo**, y **preocupación/anticipación** (*craving*), donde actúan diversos mecanismos motivacionales y se progresa desde un reforzamiento positivo (estadio atracción/intoxicación) a un reforzamiento negativo (estadio abstinencia/afecto negativo) (Koob y Le Moal, 2006). La impulsividad, por lo tanto, predomina en los estadios tempranos, mientras que la compulsividad controla los estadios más tardíos de la adicción a drogas de abuso (Koob y Volkow, 2010) (Figura 2).

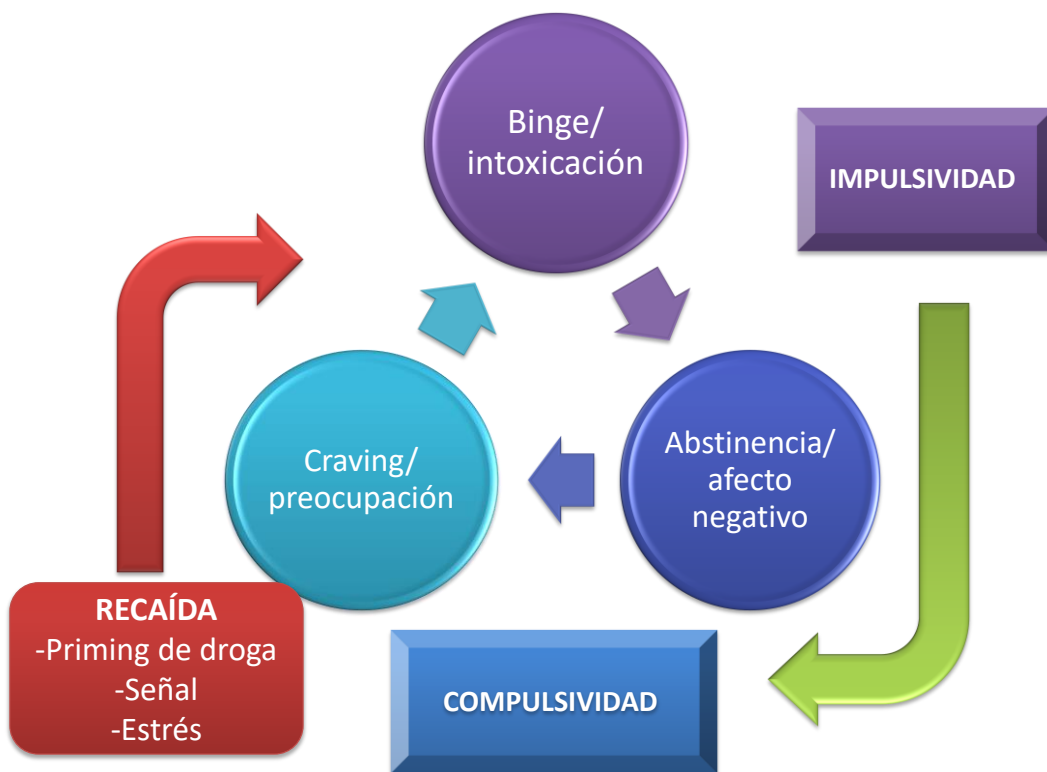


Figura 2. Ciclo de la adicción. La conducta adictiva es un proceso que va desde el uso recreacional de la droga hasta el consumo compulsivo de la droga. El ciclo incluye tres estadios, intoxicación, abstinencia y preocupación (Koob y Volkow, 2010). En la fase de intoxicación se produce un consumo impulsivo de la droga en busca de los efectos reforzantes de la misma. La fase de abstinencia, en cambio, está caracterizada por un afecto negativo y se produce cuando la persona no consume la droga. Este estadio es seguido por un deseo por consumir la droga (*craving*) contribuyendo así a que se produzca la recaída, la cual puede ser precipitada por estrés, estímulos asociados al consumo de droga, o la droga en sí misma.

El efecto reforzante o refuerzo positivo, que produce el consumo de la droga es fundamental para el comienzo del ciclo de la adicción en el estadio de **atracción/intoxicación**, siendo las drogas con alto potencial de abuso aquellas que provocan mayor efecto reforzante (Koob y Le Moal, 2006; Torregrossa et al., 2011).

Cuando el consumo de la droga es crónico, la **abstinencia** o retirada de ésta produce un estado opuesto a los efectos agudos iniciales que provoca la droga (Camí y Farré, 2003). Se presentan signos físicos y motivacionales asociados a la abstinencia, como pueden ser irritabilidad crónica, dolor físico o emocional, disforia, y pérdida de motivación por reforzadores naturales, que producen malestar y hacen que el individuo recaiga y vuelva a consumir la droga para aliviarlos o evitar que aparezcan (Koob, 2013). Dichos síntomas también pueden producirse por señales que han sido asociadas al consumo de la droga (Camí y Farré, 2003; Myers y Carlezon, 2010).

El estadio de **preocupación/anticipación** o *craving* (deseo por la droga) se considera el elemento clave en la recaída en humanos, caracterizando la adicción como un desorden crónico (G. Koob y Volkow, 2010). La recaída puede definirse como una reanudación de las conductas de búsqueda y consumo de la droga tras un periodo de abstinencia (Camí y Farré, 2003). Se han sugerido numerosos factores de riesgo para la recaída, tales como características sociodemográficas, comorbilidad psicopatológica, severidad de la adicción, baja autoeficacia, ansiedad, *craving*, consumo de varias sustancias o problemas sociales (Araos et al., 2014; Camí y Farré, 2003; Sánchez-Hervás y Llorente del Pozo, 2012). Sin embargo, generalmente se identifican tres determinantes de la recaída: la reexposición aguda a la droga (*priming*), el estrés y la exposición a estímulos o claves ambientales previamente asociadas con el consumo de la sustancia (Tabla 1) (Ahmed y Koob, 1997; Camí y Farré, 2003; Lê et al, 1998). Estos elementos desencadenan, de forma inconsciente o automática, la reanudación de conductas compulsivas de búsqueda y consumo de la droga (Everitt et al., 2008; Myers y Carlezon, 2010; Weiss et al., 2001).

Los estímulos ambientales asociados a la droga pueden ser elementos relacionados con el uso de la sustancia (jeringas, personas con las que suele consumir la droga, etc.), la hora del día, estados de ánimo, sensaciones fisiológicas o ambientes físicos determinados (Milton y Everitt, 2010). Uno de los principales motivos que precipita la recaída después de un periodo de abstinencia es la reexposición al entorno

asociado al consumo de la droga (Milton y Everitt, 2012b; Panlilio et al., 2005). Por lo tanto, entender cómo frenar el efecto que producen estas señales es un objetivo fundamental en la investigación sobre la adicción (Myers y Carlezon, 2010).

Tabla 1. Definiciones de los términos más empleados en adicción a drogas de abuso.

Abuso de drogas	Consumo recurrente de la droga a pesar de los efectos adversos que conlleva a nivel personal, social o laboral.
Dependencia de drogas	Conjunto de síntomas cognitivos, conductuales y fisiológicos debido al consumo recurrente de la droga a pesar de sus consecuencias clínicamente significativas. Debe cumplir al menos tres de los siguientes síntomas para ser diagnosticado: síntomas de tolerancia; síntomas de abstinencia; consumo de grandes cantidades de droga o durante un largo periodo de tiempo; fracaso en el control del uso de la droga; gran esfuerzo en obtener la droga; reducción de actividades laborales, lúdicas o sociales debido al uso de drogas; y un uso recurrente de la droga a pesar de los problemas de salud, sociales y económicos que conlleva.
Refuerzo	Estímulo que es interpretado como intrínsecamente positivo o gratificante.
Síndrome de abstinencia	Conjunto de síntomas que se producen tras el cese o reducción del consumo de la droga, o por el bloqueo de las acciones de ésta mediante un antagonista. También pueden aparecer los síntomas por exposición a los estímulos asociados con el uso de la droga (abstinencia condicionada). Los síntomas suelen ser los opuestos a los efectos provocados por el consumo de la droga. La abstinencia es una de las causas del consumo compulsivo de droga y de la recaída a corto plazo.
Craving o dependencia psicológica	Intenso deseo por consumir la droga y es la principal causa de las recaídas después de un largo periodo de abstinencia.
Priming	Nueva exposición a la droga de abuso, lo que precipita la reanudación de su consumo después de un periodo de abstinencia.
Recaída	Reanudación de las conductas de búsqueda y consumo de droga después de un periodo de abstinencia. Las principales causas de la recaída son el estrés, un <i>priming</i> , o señales ambientales asociadas con el consumo de la droga .
Sensibilización	Incremento de los efectos producidos por la droga después de su administración repetida. También hace referencia a la hipersensibilidad persistente a los efectos de la droga en una persona que ha consumido previamente esa droga.
Tolerancia	Disminución de los efectos producidos por la droga tras un consumo prolongado, por lo que el sujeto necesita mayores dosis para obtener los efectos iniciales que antes conseguía con una dosis más baja.

3. LA ADICCIÓN COMO UN PROCESO DE APRENDIZAJE DESADAPTATIVO

Un reciente modelo explicativo conceptualiza la drogadicción en base a procesos y mecanismos normales de aprendizaje y memoria que se vuelven desadaptativos (Badiani, 2013; Milton y Everitt, 2012b; Torregrossa et al., 2011). Por lo tanto, se considera que el uso de la droga inicia un proceso de aprendizaje por el cual los efectos interoceptivos reforzantes de la droga (estímulo incondicionado, EI), llegan a ser asociados, tras un consumo repetido, a diferentes estímulos (estímulo condicionado, EC) capaces de elicitar por sí mismos el deseo por la droga y desencadenar conductas automáticas de búsqueda y consumo de la misma (respuesta condicionada, RC) (Myers y Carlezon, 2010; Torregrossa et al., 2011). Este tipo de aprendizajes está mediado por un proceso de condicionamiento clásico, el cual desempeña un papel principal en la drogadicción, ya que las claves asociadas con la droga (estímulos ambientales y contextos) influyen de forma directa sobre el mantenimiento de la conducta adictiva y de la recaída tras un periodo de abstinencia (Milton y Everitt, 2010; Weiss et al., 2001) (Figura 3).

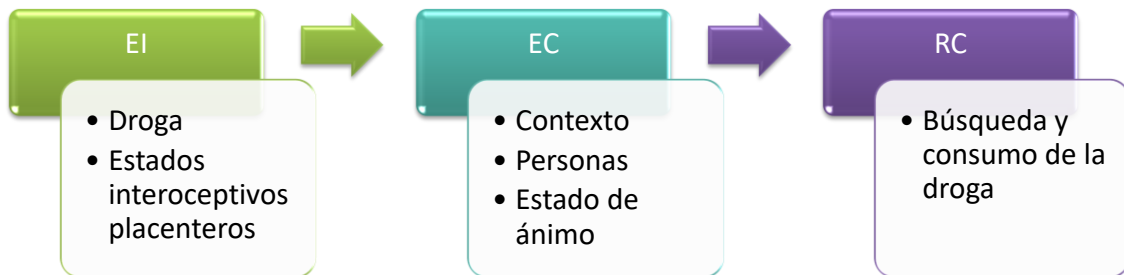


Figura 3. Proceso de aprendizaje implicado en la adicción a drogas de abuso. En el proceso adictivo, ciertos estímulos que en un principio eran neutrales van a ser asociados a los efectos producidos por las drogas de abuso. Como resultado de esta asociación, los estímulos condicionados serán capaces por sí mismos de promover el deseo de consumir droga y provocar la conducta de búsqueda de la misma. EI: estímulo incondicionado, EC: estímulo condicionado, RC: respuesta condicionada.

Desde este enfoque, la adicción es entendida como resultado de una alteración de los procesos normales de aprendizaje que llegan a ser desadaptativos, manteniendo recuerdos que precipitan las conductas de búsqueda y consumo de la droga (Milton y Everitt, 2012b; Robbins et al., 2008). De esta forma, dado que la drogadicción es un

proceso de aprendizaje, se podrían interrumpir estas asociaciones mediante un proceso de extinción (Cleva y Gass, 2010; Milton y Everitt, 2010; Torregrossa et al., 2011), e incluso sustituir estas asociaciones por otros aprendizajes propiciando nuevas contingencias o reaprendizajes que reemplacen al inicial (Chauvet et al., 2009; Starosciak et al., 2012).

La **extinción** ocurre cuando el EC se presenta de forma repetida sin que aparezca el EI de forma conjunta, lo que da lugar a una disminución progresiva de la magnitud y/o frecuencia de la RC. La extinción no es el resultado del olvido, sino que constituye un proceso de aprendizaje activo por el cual la asociación inicial del EC con el EI queda suprimida por un nuevo aprendizaje (Cleva y Gass, 2010; Myers y Carlezon, 2010). En cuanto a la adicción a las drogas, la extinción es un procedimiento que da lugar a nuevas asociaciones que permiten competir con el aprendizaje inicial, bloqueando o reduciendo las conductas de búsqueda y consumo de droga en presencia de los estímulos condicionados (Cleva y Gass, 2010; Milton y Everitt, 2012a).

Esto ha dado lugar al desarrollo de estrategias como la terapia de exposición, en la cual los individuos adictos reciben presentaciones de las claves ambientales asociadas previamente con el consumo de la droga, pero en ausencia de la misma (Milton y Everitt, 2012a). Sin embargo, este tipo de terapia, realizada en un entorno clínico, generalmente no previene la recaída cuando los individuos regresan a sus contextos originales de consumo (Carter y Tiffany, 1999). Esto es debido a que la conducta extinguida es susceptible a la renovación: este concepto se refiere a la recuperación de la conducta condicionada previamente extinguida en un contexto de entrenamiento al regresar al contexto original de aprendizaje (Bouton y Swartzentruber, 1991). También puede darse una recuperación espontánea de la conducta extinguida debido a un deterioro de las claves contextuales de la extinción que se da con el paso del tiempo (Bouton, 1993).

4. MODELOS ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DE LA ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO

Los modelos animales han permitido un progreso en los estudios acerca de la adicción y de sus bases neurobiológicas. Aunque no existe ningún modelo animal completo del proceso adictivo que dé cuenta de todos los aspectos de la adicción humana, sí que nos brindan la posibilidad de investigar elementos específicos de este proceso (Koob y Le Moal, 2006). A continuación, se describirán brevemente los modelos animales más empleados para el estudio de la adicción, así como su fundamentación teórica.

4.1. Sensibilización de los efectos locomotores inducidos por las drogas.

La exposición crónica a cocaína produce una serie de adaptaciones en diferentes estructuras cerebrales que participan en los efectos producidos por la droga. El sistema mesolímbico dopaminérgico es uno de los elementos neurobiológicos clave en los trastornos adictivos, siendo la sensibilización conductual una consecuencia de las neuroadaptaciones inducidas por las drogas en este sistema (para una información más detallada véase apartado 6.4.).

El término **sensibilización** se refiere al incremento de los efectos producidos por una droga tras su administración repetida. Mientras que se puede desarrollar tolerancia a ciertos efectos producidos por las drogas, es posible, a su vez desarrollar sensibilización a otros síntomas asociados con el consumo de droga (Robinson y Berridge, 2003). Muchas drogas de abuso son capaces de incrementar, tanto en animales como en humanos, el arousal, la atención y la actividad motora. Drogas como la nicotina, la morfina y los psicoestimulantes (cocaína y anfetamina) incrementan progresivamente su capacidad para aumentar la locomoción cuando se administran de forma repetida, fenómeno denominado sensibilización psicomotora o **sensibilización comportamental** (SC) (Robinson y Berridge, 2003; Schoffelmeer et al., 2002). Se ha sugerido que este proceso de sensibilización comportamental juega un papel fundamental en la adquisición y mantenimiento de la conducta adictiva (De Vries et al., 1998).

Estos efectos activadores de la locomoción son mediados por sistemas neuronales involucrados también en los efectos de recompensa (Wise y Bozarth, 1987).

Además, se ha comprobado que los efectos placenteros y de recompensa de las drogas de abuso se encuentran también aumentados en animales sensibilizados (De Vries et al., 1998). El sistema mesolímbico dopaminérgico, responsable de dichos efectos, llega a estar sensibilizado tras la administración repetida de droga a largo plazo, y es el responsable de aumentar la conducta de búsqueda de droga o “*wanting*”, sugiriendo que la sensibilización es fundamental para los procesos de adicción y la fase de recaída (Robinson y Berridge, 1993). Por lo tanto, la habilidad de ciertas drogas para provocar una sensibilización neuroquímica y comportamental está relacionada con su capacidad para reinstaurar una conducta asociada a su consumo (Stewart y Vezina, 1988).

Además de los factores neurobiológicos implicados en la sensibilización comportamental, muchos estudios sugieren que otros factores, en particular el entorno en el que se administra la droga, modulan el desarrollo y la expresión de dicha sensibilización conductual (Badiani y Robinson, 2004). Por ejemplo, se ha comprobado que se produce una mayor sensibilización locomotora tras la administración repetida de cocaína en un ambiente nuevo y no en la jaula habitual del animal (Mattson et al., 2008). También se ha estudiado la importancia del entorno después de una única administración de cocaína para inducir sensibilización conductual en ratas adultas (Herbert et al., 2010; McDougall et al., 2009, 2011; McDougall et al., 2007) .

En definitiva, el modelo animal de sensibilización locomotora ha sido objeto de diferentes estudios debido a que permite predecir la capacidad de ciertas drogas para producir abuso y recaída tras un periodo de abstinencia, así como desarrollar terapias farmacológicas que sean capaces de transformar o reducir estas adaptaciones producidas por la administración a largo plazo de ciertas drogas de abuso. En cambio, este modelo posee algunas limitaciones intrínsecas ya que evalúa únicamente la locomoción, un componente indirecto del proceso adictivo.

4.2. Condicionamiento clásico: condicionamiento de lugar preferente (CLP).

El condicionamiento clásico es el mecanismo más simple por el que el organismo puede aprender acerca de las relaciones entre estímulos del medio ambiente. La aparición de una secuencia ordenada de estímulos, independientemente de la conducta del sujeto, proporciona al organismo información de qué estímulos tienden a ir emparejados con determinados eventos (Domjan, 2003).

En 1927, el fisiólogo ruso Ivan Pavlov documentó los parámetros por los cuales los individuos adquieren conductas a través de la asociación de estímulos. Pavlov se refirió a un estímulo inicialmente neutral (por ejemplo, un tono o una luz) como estímulo condicionado (EC), y al estímulo que es capaz por sí solo de provocar una respuesta incondicionada (RI, por ejemplo, la salivación) como estímulo incondicionado (EI, por ejemplo, la comida). La asociación repetida del EC con el EI hizo posible que la simple presentación del EC elicitara la respuesta condicionada (RC) de salivación (Domjan, 2003; Pavlov, 1927).

En 1965, Abraham Wikler fue el primero en publicar un artículo sobre la adicción y recaída a opiáceos considerando la importancia del condicionamiento clásico y operante (explicado en el siguiente apartado) durante la adquisición, mantenimiento-extinción y recaída de los comportamientos adictivos. Wikler destacó la importancia de los ECs, como por ejemplo el contexto asociado al consumo de la droga, y la capacidad de provocar por sí solo la recaída después de un proceso de extinción (Shaffer, 1985).

El modelo de condicionamiento de lugar preferente (CLP) es un procedimiento basado en el condicionamiento clásico utilizado para investigar los efectos reforzantes de las drogas de abuso (Katz y Gormezano, 1979). En este caso, los efectos reforzantes de la droga o EI serán asociados a un contexto determinado o EC que inicialmente tenía un valor neutral. El procedimiento consiste en exponer a los animales a dos compartimentos neutros pero con características físicas diferentes y asociar aquel compartimento en el que se administre la droga a los efectos de la misma (Figura 4). En primer lugar, el animal se expone al aparato en una fase de pre-condicionamiento en la cual el animal debería pasar el mismo tiempo en cada compartimento, dado el carácter neutral de ambos.

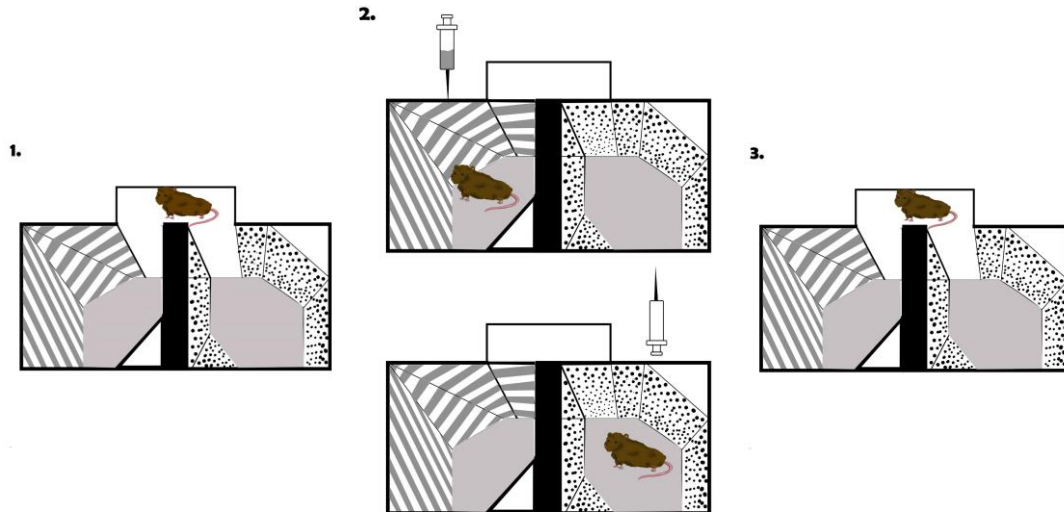


Figura 4. Procedimiento general del CLP. 1. Ensayo de Pre-condicionamiento, en la que el animal puede recorrer libremente ambos compartimentos; 2. Fase de condicionamiento. La imagen superior representa la administración de la droga en un compartimento en concreto mientras que la imagen inferior hace referencia a la administración de vehículo en el compartimento contrario; 3. Prueba de preferencia de lugar, en la que el animal explora ambos compartimentos.

El condicionamiento puede llevarse a cabo de tres maneras distintas: sesgado, no sesgado o balanceado. En el caso del condicionamiento sesgado, el protocolo consiste en administrar la droga siempre en el mismo compartimento (generalmente en el que no fue el preferido durante el pre-condicionamiento) mientras que el otro compartimento está asociado a la administración del vehículo. En el protocolo no sesgado no existe una clara preferencia por ningún compartimento durante el pre-condicionamiento, por lo que se asigna al azar la administración de la droga o de vehículo en cada compartimento. Por último, el protocolo balanceado consiste en asignar a los animales a cada compartimento asociado a la droga, de forma que para cada compartimento hayan condicionado el mismo número de animales (Aguilar et al., 2009).

Tras el condicionamiento, se permite al animal explorar libremente ambos compartimentos y el tiempo que pasa en el compartimento asociado a la droga es un índice indirecto de los efectos reforzantes de ésta (Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2009; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007). Por lo tanto, el animal mostrará preferencia de lugar condicionada al contexto en el que ha experimentado un refuerzo positivo y, en cambio, aversión de lugar condicionada al contexto que le induzca un estado aversivo (Bagdas et al., 2016; Zan et al., 2016).

Después de que se haya producido el condicionamiento contextual, se puede someter a los animales a un procedimiento de extinción, en el cual son expuestos al compartimento previamente asociado a la droga pero sin la administración de la misma. La persistencia en la búsqueda de droga durante la extinción resulta muy útil para evaluar las propiedades reforzantes de la droga (Aguilar et al., 2009). Generalmente, el CLP se considera extinguido cuando no existen diferencias entre el tiempo que el animal pasa en el compartimento asociado a droga durante la extinción y el tiempo que pasó en el mismo compartimento durante el pre-condicionamiento. La extinción puede llevarse a cabo de dos formas: confinada o sin confinar. En el primer caso, la extinción confinada consiste en administrar vehículo en cada compartimento en días alternos (Galaj et al., 2016; Malvaez et al., 2010), mientras que la extinción sin confinar consiste en repetir la sesión test hasta que no se observe preferencia por el compartimento previamente asociado a la droga (Carey et al., 2007; Maldonado et al., 2007; Sartor et al., 2016). Una vez que el CLP ha sido extinguido puede inducirse la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga mediante una dosis *priming* de la droga (Guan et al., 2014; Maldonado et al., 2007; Sørensen et al., 2013) o por exposición a estímulos emocionalmente intensos o estresantes (Lu et al., 2001; Lu et al., 2002; Sanchez et al., 2003).

Una limitación importante de este modelo es la imposibilidad del animal de autoadministrarse la droga, ya que la recibe de forma pasiva administrada por el experimentador. Esto constituye una restricción en el estudio del proceso adictivo, cuyo objetivo es identificar el patrón determinado de búsqueda y consumo de drogas de abuso (Bardo y Bevins, 2000). De todas formas, el modelo de condicionamiento de lugar preferencial es una forma sencilla, rápida y económica de evaluar el efecto reforzante de las drogas asociado de forma contingente a estímulos contextuales (Carboni y Vacca, 2003).

4.3. Condicionamiento operante o instrumental: autoadministración intravenosa.

El condicionamiento operante o instrumental nace de la teoría psicológica del aprendizaje desarrollada por el psicólogo Burrhus F. Skinner. Este paradigma está basado en la contingencia entre las respuestas que realizan los individuos y las consecuencias derivadas de las mismas, lo cual va a modificar la probabilidad de que dicha respuesta se repita en un futuro (Skinner, 1938). Se define **refuerzo** como aquella consecuencia de una conducta que va a aumentar la probabilidad de que se repita en el futuro. Mientras que un refuerzo positivo supone una recompensa, un refuerzo negativo ocurre cuando se elimina un estímulo aversivo. En cambio, un **castigo** es aquella consecuencia de una conducta que es capaz de disminuir la probabilidad de su ocurrencia en el futuro (Tabla 2). Aquí también puede diferenciarse un castigo positivo, aquella consecuencia por la cual aparece un estímulo aversivo, y un castigo negativo en la cual se produce la pérdida de un estímulo reforzante (Domjan, 2003).

Un modelo animal basado en este tipo de aprendizaje y que ha mostrado ser eficaz para evaluar las propiedades reforzantes de las drogas de abuso ha sido la autoadministración, siendo la más empleada la autoadministración por vía intravenosa, aunque también se utilicen otras rutas como la oral (Besheer et al., 2010; Lê et al., 2010) o la intracerebral (Braida et al., 1998).

En el modelo de autoadministración, el animal aprende que realizando una determinada conducta (como puede ser presionar una palanca o introducir el hocico en un agujero) va a obtener un efecto reforzante producido por la administración inmediata de la droga. La droga, por lo tanto, es considerada como refuerzo si aumenta la probabilidad de la respuesta cuando va asociada a la exposición de la sustancia, pudiendo generar su consumo compulsivo que caracteriza a los trastornos de adicción (Koob et al., 2004).

Para poder discriminar que la respuesta se produzca de manera intencionada, y no simplemente de manera azarosa, se emplean dos opciones de respuestas (ya sean palancas o agujeros) en la caja de autoadministración (Figura 5). Una de ellas conducirá siempre a una respuesta activa, produciendo la administración intravenosa de la droga, mientras que la otra opción consiste en una respuesta inactiva que no conlleva la consecución del refuerzo, no administra droga.

Tabla 2. Definiciones de los términos utilizados en el condicionamiento clásico y el condicionamiento instrumental.

Condicionamiento clásico o Pavloviano	Aprendizaje por el cual un estímulo inicialmente neutral es asociado, por su presentación espacio-temporal, a otro estímulo motivacionalmente relevante. La presentación de ambos estímulos es independiente a la conducta del sujeto.
Estímulo incondicionado (EI)	Estímulo que es motivacionalmente relevante para el sujeto de forma intrínseca.
Respuesta incondicionada (RI)	Respuesta elicitada automáticamente por la presentación de un estímulo incondicionado.
Estímulo condicionado (EC)	Estímulo que previamente era neutral y ha sido asociado con el EI.
Respuesta condicionada (RC)	Respuesta aprendida que es elicitada por la presentación del EC. Puede ser igual o diferente a la respuesta que producía el EI antes del condicionamiento.
Condicionamiento instrumental u operante	Aprendizaje en el cual la consecuencia producida por la conducta del sujeto conlleva a una mayor o menor repetición de la misma. Este aprendizaje puede darse a través de un reforzamiento positivo, un reforzamiento negativo o un castigo.
Reforzamiento	Procedimiento por el que la presentación de un estímulo hace que aumente la probabilidad de repetir una conducta en el futuro.
Reforzamiento positivo	Procedimiento en el condicionamiento instrumental por el que aumenta la probabilidad de repetir una conducta, ya que conlleva la aparición de un estímulo apetitivo.
Reforzamiento negativo	Procedimiento en el condicionamiento instrumental por el que aumenta la probabilidad de repetir una conducta que conlleva la evitación de un estímulo aversivo.
Castigo	Procedimiento en el condicionamiento instrumental por el que disminuye la probabilidad de respuesta de una conducta, ya que sus consecuencias son negativas para el sujeto.

Además de evaluar la eficacia de las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, el modelo de autoadministración nos permite también evaluar aquellos procesos implicados en la conducta adictiva, como son la adquisición, el mantenimiento, la extinción o la recaída.

En la fase de adquisición, los animales aprenden a discriminar entre el manipulando activo y el inactivo para la obtención del refuerzo. Suele iniciarse con un programa de razón fija tipo 1 (FR1), en el cual cada respuesta activa conlleva a la obtención de la droga. Además, la droga se acompaña de un estímulo (suele ser luz o tono), que permite un aprendizaje asociativo entre ambos, por el cual este último adquiere valor de estímulo condicionado.

Durante la fase de mantenimiento, el animal ya ha aprendido que la droga tiene propiedades reforzantes y cuál es la respuesta necesaria para obtenerla. En esta fase se puede aumentar el esfuerzo que se requiere del animal para obtener el refuerzo

incrementando el valor de razón fija necesaria para su obtención. En este sentido, pueden utilizarse protocolos de razón progresiva (PR) donde va aumentando progresivamente el número de respuestas requeridas para que el animal obtenga el refuerzo. La sesión finaliza cuando el animal deja de responder y, por tanto, no obtiene más refuerzos. El ratio final se denomina *break point* (o punto de corte) y puede cambiar en función de variables motivacionales, por lo que puede ser útil como un índice de la fuerza del reforzador (Hodos y Kalman, 1963). Este punto, por lo tanto, refleja el esfuerzo máximo que el animal está dispuesto a realizar para obtener la droga y proporciona información sobre la motivación del animal hacia la droga. Uno de los primeros usos del PR fue para investigar el orden de las drogas según su capacidad para generar abuso, en función de donde se situase el *break point*, como por ejemplo en las drogas psicoestimulantes y opioides (Zhou et al., 2004).

Un programa de razón progresiva permite, por tanto, diferenciar una mera conducta de autoadministración de droga, de la conducta compulsiva de autoadministración que es característica en la adicción (Robinson, 2004). El aumento en la respuesta durante un programa de PR permite interpretar con mayor fiabilidad un aumento de la motivación del animal por el consumo de la droga, y tiene menos influencia de otros factores que ocurren bajo un programa FR, tales como el desarrollo de tolerancia o el efecto de saciación a la droga. Además, se ha comprobado que el PR tiende a desplazar hacia arriba la función lineal dosis-respuesta, lo que es menos ambiguo que la forma de U invertida que se obtiene bajo programas de FR (Thomsen y Caine, 2006).

Por último, puede desarrollarse un proceso de extinción, en el que deja de presentarse la droga después de la realización de la conducta requerida. Los protocolos de extinción también permiten evaluar la motivación del animal por consumir la droga analizando la persistencia del comportamiento de búsqueda de droga (Harris, Pentel y Lesage, 2007).

Una vez finalizado este proceso, la única presencia del estímulo condicionado produce un incremento en la conducta operante de búsqueda de la droga (Deroche-Gamonet y Piat, 2002). Este modelo de recaída permite estudiar no sólo la conducta de **ingesta de droga**, sino también la conducta de **búsqueda de la droga** (See, 2002), y

hace posible el conocimiento de los mecanismos de adicción de forma similar a como ocurren en humanos.

Este modelo, además de ser útil para estudiar el comportamiento adictivo, permite estudiar las bases biológicas implicadas en el mismo y desarrollar nuevos tratamientos para la adicción (Haney y Spealman, 2009). Además, este modelo empleado en animales de experimentación, ha demostrado tener alta validez predictiva para identificar drogas con alto potencial de abuso en humanos, ya que las drogas que los animales de experimentación se autoadministran son las mismas con potencial de abuso en humanos (Balster, 1991).

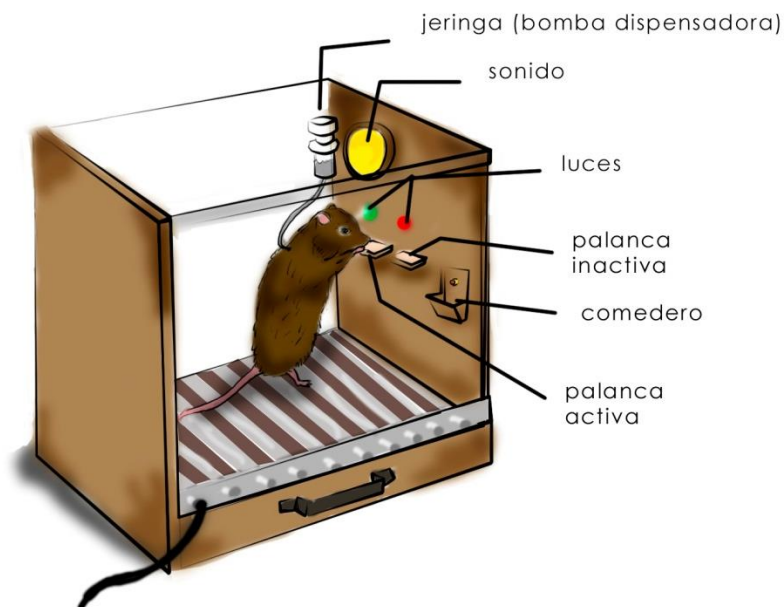


Figura 5. Ejemplo de una caja de condicionamiento operante con los elementos necesarios para presentar Estímulos (sonidos, luces), realizar Respuestas (palancas activa e inactiva) y recibir reforzadores/castigos (comedero, jeringa/bomba de autoadministración, rejilla electrificada).

5. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

5.1. Circuito cerebral implicado en los efectos reforzantes de las drogas de abuso.

Existen numerosas evidencias científicas de la importancia de la dopamina en el proceso adictivo (Berridge, 2007). El sistema dopaminérgico está integrado por 3 vías diferentes: la vía nigroestriatal, en la cual la sustancia negra proyecta al cuerpo estriado y está implicado en la regulación de la actividad motora; la vía tuberoinfundibular con proyecciones desde el núcleo arqueado del hipotálamo a la hipófisis anterior y al infundíbulo, se encarga de controlar la liberación de prolactina; y la vía dopaminérgica mesocorticolímbica, con proyecciones desde el área tegmental ventral (ATV) al núcleo accumbens (NAcc), hipocampo, tubérculo olfatorio, amígdala, corteza prefrontal (CPF) y septum. El NAcc, a su vez, tiene proyecciones eferentes hacia el pálido ventral y el ATV, formando un bucle recíproco de control. Esta última vía constituye el principal circuito de recompensa de todas las drogas de abuso.

El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico es uno de los elementos neurobiológicos clave en los trastornos adictivos (Figura 6). Los primeros estudios, que se llevaron a cabo durante los años 50, fueron realizados por Olds y Milner mediante la técnica de autoestimulación intracraneal (ICSS), y comprobaron que cuando los electrodos se situaban en el sistema mesocorticolímbico los animales aumentaban el número de presiones de palanca (Olds y Milner, 1954). Una serie de estudios posteriores llevados a cabo por Olds y otros investigadores identificaron distintos centros de refuerzo, particularmente el haz prosencefálico medial, que proyecta desde el ATV a través del hipotálamo lateral hacia el NAcc (Wise, 1998).

Más tarde se identificó a la dopamina como el neurotransmisor responsable de activar el sistema implicado en el refuerzo (Carlsson et al., 1957). A continuación, estudios desarrollados durante las décadas de 1970 y 1980 determinaron que la inhibición farmacológica o anatómica de la señalización dopaminérgica perjudicaba las conductas relacionadas con el refuerzo, tales como la ingesta, autoestimulación eléctrica, contacto sexual y conductas de búsqueda de drogas de abuso (para una revisión véase Wise, 2004, 1998).

Debido a que todas las drogas de abuso tienen en común la capacidad de producir efectos reforzantes estimulando el sistema dopaminérgico e incrementando los niveles de dopamina en las proyecciones mesolímbicas, principalmente en NAcc y CPF (Berridge, 2007), se formuló la “hipótesis dopaminérgica de la adicción” (Di Chiara e Imperato, 1988; Wise y Bozarth, 1987). Tal es el caso de los psicoestimulantes, como por ejemplo la cocaína, que producen un aumento de los niveles de dopamina en el ATV y NAcc, centros implicado en el control de las recompensas, lo que explica el gran potencial de estas drogas en generar efectos reforzantes y adicción (Caballero, 2005; Roberts y Koob, 1982). Ambas estructuras son importantes en mediar los efectos reforzantes agudos producidos por las drogas de abuso. Se ha comprobado que lesiones del NAcc y del ATV atenúan la autoadministración de drogas como la cocaína y la heroína (Roberts et al., 1980; Roberts y Koob, 1982).

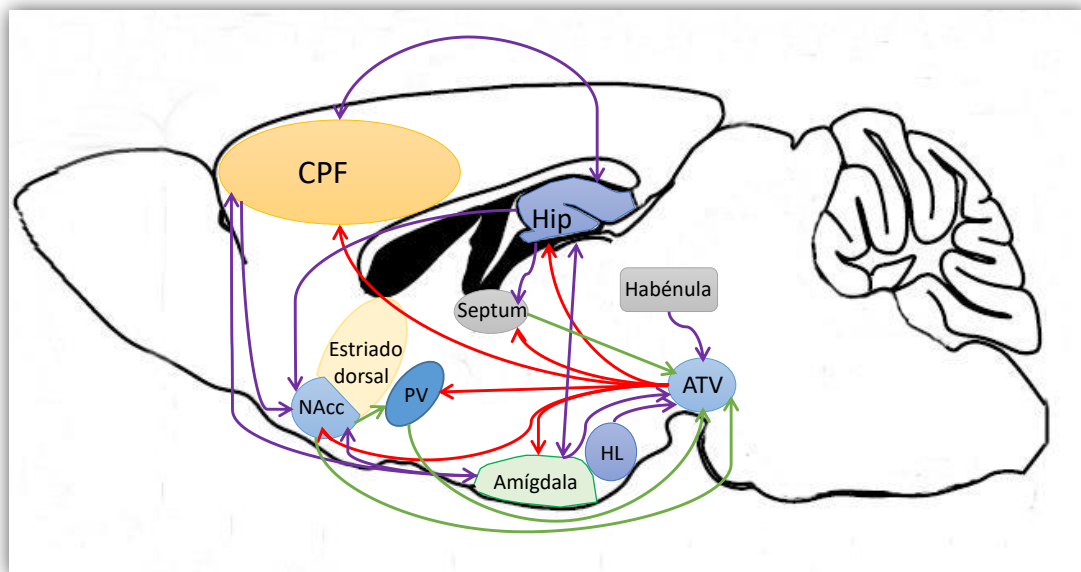


Figura 6. Sistema implicado en la adicción a drogas de abuso. Esquema simplificado del neurocircuito implicado en el proceso adictivo. En rojo, proyecciones dopaminérgicas; en púrpura, proyecciones glutamatérgicas; en verde, proyecciones gabaérgicas. CPF: Corteza Prefrontal; Hip: Hipocampo; ATV: Área Tegmental Ventral; HL: Hipotálamo lateral; PV: Pálido ventral; NAcc: Núcleo Accumbens.

Por lo tanto, este incremento de los niveles de dopamina en el sistema de recompensa es un paso necesario para producir los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso y para el desarrollo de trastorno adictivos. Además, se ha comprobado

que las drogas de abuso producen una recompensa mucho más potente e inmediata que la que se produce por reforzadores naturales, lo que explica su elevada potencia para generar adicción (Goldstein, 2001).

Otra estructura involucrada en los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso es la amígdala central (ACe). De acuerdo con esto, microinyecciones de antagonistas de receptores D1 en la ACe bloquean la autoadministración de cocaína (Caine et al., 1995). Además, se ha estudiado la importancia del pálido ventral (PV), ya que recibe aferencias desde el NAcc. Así, se ha demostrado que la lesión del PV disminuye la autoadministración intravenosa de cocaína y de heroína (Hubner y Koob, 1990), resultado que sugiere que esta región es importante para mediar los efectos reforzantes de ambas drogas (Tabla 3).

También se ha estudiado el hipocampo como una estructura imprescindible para la formación de memorias contextuales relacionadas con el consumo de droga (Hernández-Rabaza et al., 2008; Meyers et al., 2006). De acuerdo con esto, lesiones en el giro dentado del hipocampo bloquea la adquisición del CLP inducido por cocaína. Además, se ha comprobado que lesiones o la inactivación funcional del hipocampo dorsal perjudica la adquisición y expresión del CLP inducido por cocaína (Meyers et al., 2003; Meyers et al., 2006; Otis et al., 2014).

5.2. Circuitos implicados en la recaída.

Debido a que el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico es el responsable de los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso, los cambios desarrollados en estas estructuras después de una exposición crónica a las mismas puede mediar en las conductas de deseo y búsqueda de droga, lo que propicia la recaída (Feltenstein y See, 2008). En concreto, el NAcc es una estructura que recibe inputs desde el ATV, CPF, amígdala e hipocampo, por lo que es un mediador fundamental en las conductas de búsqueda de refuerzos (Feltenstein y See, 2008; Mogenson et al., 1980). El NAcc está compuesto por dos subregiones, la zona central (*core*) y la corteza (*shell*), que difieren en morfología y en sus conexiones aferentes y eferentes (Ambroggi et al., 2011). Además, se ha comprobado que estas subregiones participan en diferentes fases dentro del proceso adictivo (Peters, LaLumiere y Kalivas, 2008). En concreto, en ausencia de droga, el NAcc *core* está implicado en conductas instrumentales y está conectado con

sistemas motores, mientras que el NAcc *shell* participa en la modulación emocional y en la motivación apetitiva (Kelley, 2004; Sesack y Grace, 2010). Lesiones en el NAcc *core* perjudican la adquisición de conductas de búsqueda de droga cuando la respuesta debe realizarse en presencia de un estímulo asociado con cocaína (Ambroggi et al., 2011). Consistente con estos hallazgos, la inactivación del *core* del NAcc, pero no del *shell*, bloquea la reinstauración inducida por señales asociadas al consumo de cocaína (Fuchs et al., 2004; Kalivas y McFarland, 2003). En cambio, lesiones en el NAcc *shell* atenúa los efectos psicoestimulantes de la cocaína (Ito et al., 2004).

Otra estructura que forma parte del circuito cerebral de la adicción es la CPF, incluyendo la corteza prelímbica (CPL) y la corteza orbitofrontal (COF). Se ha demostrado que la activación de las sinapsis entre la CPL y el NAcc *core* son necesarias para que se lleve a cabo la reinstauración inducida por señales previamente asociadas a la conducta de autoadministración de cocaína previamente extinguida (Kalivas, Volkow y Seamans, 2005; McLaughlin y See, 2003).

La amígdala es otra estructura que recibe proyecciones dopaminérgicas desde el ATV. Esta estructura está constituida por distintos núcleos, entre los que cabe destacar la amígdala basolateral (BLA, del inglés *Basolateral Amygdala*), el núcleo cortical, la amígdala medial y la amígdala central extendida (esta última incluye la ACe y el núcleo del lecho de la estría terminal [BNST, del inglés *Bed Nucleus of the Stria Terminalis*]) (Jolkkonen y Pitka, 1998). La BLA participa en la formación de las asociaciones entre la droga con los estímulos condicionados, y sus conexiones sinápticas con el NAcc *core* participan en la recaída inducida por señal (Feltenstein y See, 2008). Se ha comprobado que la inactivación de esta estructura atenúa la reinstauración inducida por señal (McLaughlin y See, 2003). En cambio, la amígdala extendida es una estructura que participa en la modulación de la respuesta emocional, incluidas aquellas respuestas emocionales relacionadas con la adicción (Kalivas y McFarland, 2003). De acuerdo con este hecho, la amígdala extendida está implicada en la recaída de búsqueda de droga inducida por estrés (Kalivas y McFarland, 2003).

Debido a la importancia del hipocampo en el establecimiento de asociaciones contextuales con el consumo de droga, se ha estudiado su implicación en el *craving* y la recaída (revisado en Castilla-Ortega et al., 2016). De esta forma, se ha demostrado que, después de la extinción de la conducta de autoadministración de cocaína, la inactivación

del hipocampo dorsal es capaz de bloquear la reinstauración de búsqueda de cocaína inducida por contexto (Fuchs et al., 2005). Además, se ha comprobado que la inactivación del hipocampo ventral perjudica la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga (en concreto, de cocaína) inducida por señal y por *priming* de cocaína (Rogers y See, 2007).

5.3. Circuitos implicados en la búsqueda compulsiva de la droga.

Como ya se ha mencionado, las propiedades reforzantes agudas de los psicoestimulantes dependen de la activación del sistema mesolímbico dopaminérgico. En cambio, el estriado dorsal parece ser importante, no tanto en los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso, sino en el desarrollo de la búsqueda compulsiva de la droga (Everitt et al., 2008). Esta transición que va desde un consumo controlado a un hábito compulsivo puede ser el resultado del paso de un control conductual desde el estriado ventral al estriado dorsal, así como de una disminución progresiva en el control inhibitorio de la CPF sobre los hábitos de búsqueda de droga (Everitt y Robbins, 2005). Se ha observado un incremento de DA en el estriado dorsal durante la conducta de búsqueda de cocaína (Ito et al., 2002). De acuerdo con esto, un estudio reciente ha demostrado que la administración de un antagonista de receptores dopaminérgicos en el estriado dorsolateral disminuyó la búsqueda compulsiva de droga en un modelo de autoadministración con cocaína (Murray et al., 2014).

Además, la conducta compulsiva de búsqueda de droga está asociada con los sistemas cerebrales implicados en la respuesta al estrés, en el cual participa la amígdala extendida y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). Tanto la amígdala extendida como el eje HPA secretan diversos neuropéptidos y hormonas relacionadas con el estrés, como son la hormona estimulante de corticotropina (CRF, del inglés *Corticotropin Releasing Factor*), orexina, dinorfina y vasopresina (Koob, 2008). Estas moléculas pueden ser liberadas tanto en situación de estrés como tras el cese del consumo de drogas, y son capaces de alterar las estructuras relacionadas con el sistema de refuerzo (Koob, 2008). En concreto, el incremento de CRF en respuesta al estrés, incrementa la excitabilidad y la densidad de los receptores NMDA en las neuronas dopaminérgicas del ATV (Borgland et al., 2010; Koob, 2008). Además, el incremento de CRF en el ATV provoca un aumento de DA, efecto que puede ser bloqueado con la administración de un antagonista del receptor CRF en ATV (Borgland et al., 2010;

Wang et al., 2005). En cuanto a la implicación de CRF en el proceso adictivo, se ha comprobado que después de una administración crónica de un cannabinoide sintético, el bloqueo con un antagonista de los receptores cannabinoides provoca un aumento de la liberación de CRF que correlaciona con los síntomas conductuales de abstinencia (Rodríguez de Fonseca et al., 1997). También se ha demostrado que la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga inducida por estrés es bloqueada tras la administración de un antagonista para dicho receptor en el ATV (Borgland et al., 2010; Wang et al., 2005).

5.4. Otros circuitos cerebrales implicados en el proceso adictivo.

Existen otras estructuras que pueden participar en las conductas relacionadas con la adicción, como son la habénula, la ínsula y el septum lateral. La habénula envía sus proyecciones al ATV y a la *pars compacta* de la sustancia negra (SNc) y recibe aferencias desde el hipotálamo lateral, el septum y el estriado dorsal (Hikosaka, 2010). Se ha comprobado que la habénula lateral inhibe la activación de neuronas del ATV y de la SNc (Fowler et al., 2011). Además, ante la ausencia de un refuerzo esperado, las neuronas de la habénula lateral se activan para inhibir el incremento de DA en el ATV, por lo que se ha propuesto que funciona como un centro de control para predicciones de refuerzos que no llegan a presentarse (McGinty et al., 2011).

La ínsula está asociada con la interocepción y la toma de decisiones (Naqvi y Bechara, 2009). Esta estructura recibe *inputs* de estructuras implicadas en la adicción, incluyendo la corteza cingulada anterior, la CPF ventromedial, la amígdala y el estriado ventral. Mientras que la activación de la ínsula está asociada con el deseo por consumir nicotina, cocaína, alcohol y heroína, su inactivación perjudica la recaída a nicotina y a metanfetamina (Naqvi y Bechara, 2010).

Por último, el septum lateral, que proyecta al hipotálamo lateral y al ATV, participa en el condicionamiento contextual inducido por droga. Se ha observado que la inactivación del septum lateral bloquea la preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína (Aston-jones et al., 2010; Sartor y Aston-Jones, 2012).

Tabla 3. Resumen de las diferentes estructuras que participan en la adicción a drogas de abuso y su implicación funcional

ATV y NAcc	Control de las recompensas: median los efectos reforzantes agudos de las drogas de abuso.	Lesiones del NAcc y del ATV atenúan la autoadministración de drogas como la cocaína y la heroína (Roberts et al., 1980; Roberts y Koob, 1982).
ACe	Participa en los efectos reforzantes agudos de las drogas.	Antagonistas D1 en CeA bloquean la autoadministración de cocaína (Caine et al., 1995).
PV	Participa en los efectos reforzantes agudos de las drogas.	Lesión disminuye la autoadministración de cocaína y heroína (Hubner y Koob, 1990).
Hipocampo	Formación de memorias contextuales relacionadas con el consumo de drogas.	Lesión del giro dentado bloquea la adquisición de CLP inducido por cocaína (Hernández-Rabaza et al., 2008). Lesión del hipocampo dorsal perjudica la adquisición y expresión de CLP inducido por cocaína (Meyers et al., 2003; 2006).
NAcc core	Implicado en la conducta instrumental de búsqueda de droga.	Lesión del <i>core</i> bloquea la reinstauración inducida por señales asociadas al consumo de cocaína (Fuchs et al., 2004; Kalivas y McFarland, 2003).
NAcc shell	Modulación emocional y deseo por consumir droga.	Lesiones en el NAcc <i>shell</i> atenúa los efectos psicoestimulantes de la cocaína (Ito et al., 2004).
CPF	Función ejecutiva y control de impulsos.	Inactivación de PLC perjudica la reinstauración inducida por señales a la conducta de búsqueda de cocaína (McLaughlin y See, 2003).
BLA	Responsable de la formación de asociaciones droga-estímulo.	Inactivación de la BLA atenúa la reinstauración inducida por señal (McLaughlin y See, 2003).
Amígdala extendida	Implicado en la modulación de la respuesta emocional, incluyendo las relacionadas con la adicción .	Implicada en la recaída de búsqueda de droga inducida por estrés (Kalivas y McFarland, 2003).
Hipocampo	Participa en el <i>craving</i> y recaída.	Inactivación hipocampo dorsal bloquea la reinstauración inducida por contexto (Fuchs et al., 2005). Inactivación hipocampo ventral perjudica la reinstauración inducida por señal y por <i>priming</i> de droga (Rogers y See, 2007).
Estriado dorsal	Relevancia en la búsqueda compulsiva de droga (formación de hábitos).	El bloqueo de receptores dopaminérgicos en el estriado dorsolateral disminuyó la búsqueda compulsiva de droga en autoadministración con cocaína (Murray et al., 2014).
Amígdala extendida y eje HPA	Relacionado con la respuesta al estrés y su influencia en la búsqueda de droga.	CRF produce la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga inducida por estrés (Borgland et al., 2010; Wang et al., 2005).
Habénula	Integra información emocional y cognitiva.	La habénula se activa ante la ausencia de un refuerzo esperado (McGinty et al., 2011).
Ínsula	Responsable de la interocepción y toma de decisiones.	Su activación produce <i>craving</i> por nicotina, cocaína, alcohol y heroína (Naqvi y Bechara, 2010).
Septum lateral	Participa en el condicionamiento contextual inducido por droga.	Su inactivación bloquea la CLP inducida por cocaína (Aston-jones et al., 2010; Sartor y Aston-Jones, 2012).

6. LA COCAÍNA

6.1. Datos epidemiológicos e importancia de su estudio.

Los psicoestimulantes son sustancias con gran potencial para disminuir los umbrales de alerta, facilitando la respuesta a estímulos exógenos o endógenos por parte del individuo. Los psicoestimulantes se clasifican en tres grandes familias: anfetamínicos, alcaloides naturales y metilxantinas. Estas últimas son sustancias energizantes con menor riesgo y potencial de abuso. En cambio, la anfetamina y la cocaína provocan efectos similares sobre el estado de ánimo, pero inducen toxicidad crónica y poseen un alto potencial de abuso y dependencia (Fernández-Espejo, 2006).

La adicción a psicoestimulantes adquiere una enorme importancia para los sistemas de salud pública. Datos epidemiológicos recientes demuestran que el consumo de cocaína, en lugar de estabilizarse, sigue en continuo crecimiento (Sánchez-Hervás y Llorente del Pozo, 2012). Durante la última década, en Europa se han incrementado los problemas relacionados con el uso y la incautación de cocaína, llegando a ser la droga ilícita más consumida tras el cannabis (Mena et al., 2013; Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2014; Spronk, van Wel, Ramaekers y Verkes, 2013). Más de 14 millones de europeos de edades comprendidas entre los 15-64 años han consumido cocaína al menos una vez en su vida (Mena et al., 2013; Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2014).

Precisamente, España es uno de los países europeos con mayores tasas de prevalencia de consumo de cocaína, particularmente en adultos jóvenes (Mena et al., 2013; Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2014; Sánchez-Hervás y Llorente del Pozo, 2012) (Figura 7). En nuestro país, un 10,3% de la población ha consumido cocaína al menos una vez en su vida, comprobándose un crecimiento en la prevalencia de su consumo desde el año 1995 (3,7%) hasta el año 2013 (10,3%) (Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, 2015). La edad media de inicio del consumo de cocaína en España es a los 23,2 años para el consumo de cocaína base y a los 21,3 para la cocaína en polvo. Es importante destacar que al tratarse de una droga ilegal, resulta muy difícil, sino imposible, disponer de estimaciones exactas y precisas (Degenhardt y Hall, 2012).

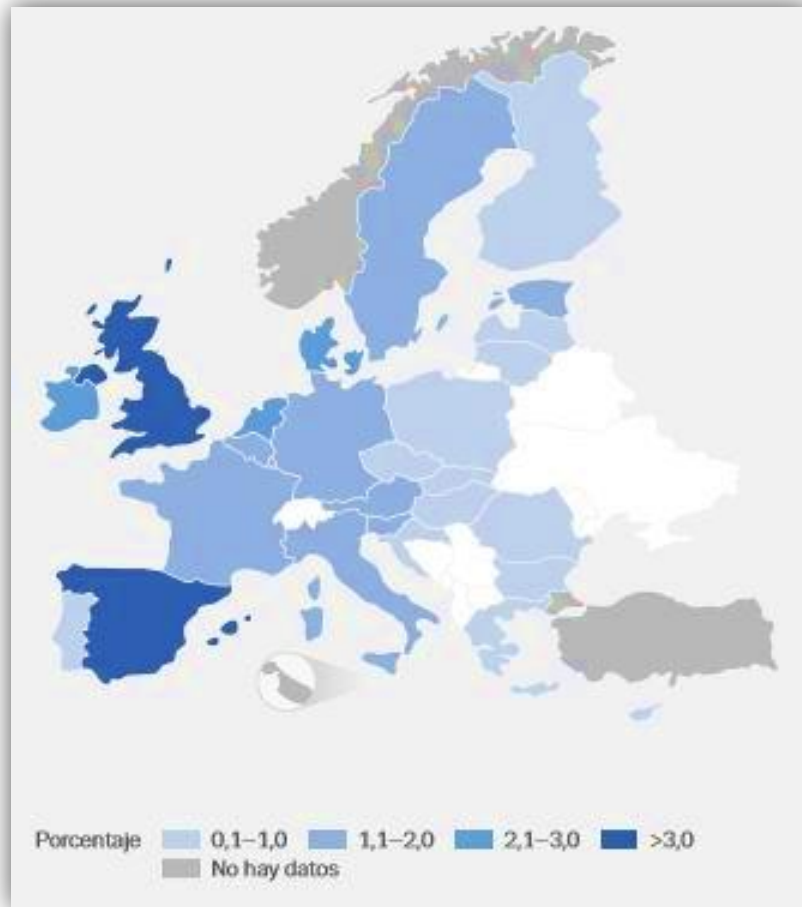


Figura 7. Prevalencia del consumo de cocaína en el año 2014. La imagen muestra la prevalencia del consumo de cocaína en los distintos países de Europa entre adultos jóvenes (de 15 a 34 años). Como puede observarse, España es uno de los países con mayor prevalencia de consumo de cocaína (más de un 3% de la población ha consumido cocaína en el año 2014 en nuestro país). Imagen tomada del informe anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2014.

El riesgo de dependencia a la cocaína es mayor que en otras drogas de abuso, por lo que un porcentaje elevado de individuos (especialmente jóvenes) se vuelve dependiente incluso en cortos intervalos de tiempo (Wagner y Anthony, 2002). Esta característica junto con las repercusiones legales y laborales que conlleva, así como sus consecuencias sobre el sistema sanitario (Mena et al., 2013), convierte el consumo de cocaína en un problema para la sociedad y para el propio individuo (Strang et al., 2012). La cocaína es responsable de numerosos casos de hospitalización por problemas agudos asociados a su consumo, lo que genera altos costes económicos (Milton y Everitt, 2012a; Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2014). Las consecuencias personales del abuso de cocaína son múltiples: genera numerosas

complicaciones médicas (García-Fernández et al., 2012; Mena et al., 2013), incrementa el riesgo de enfermedades infecciosas (e. g., SIDA), discapacidad, muerte prematura y suicidio (Degenhardt y Hall, 2012) y se asocia frecuentemente con problemas cognitivos y psicopatológicos (Araos et al., 2014; Spronk et al., 2013). Además, el consumo de esta droga puede influir en la mortalidad debido a los problemas cardiovasculares que produce (Milton y Everitt, 2012a).

Hay que tener en cuenta, además de estos problemas personales, sanitarios y económicos, la naturaleza crónica de la adicción a las drogas de abuso, en concreto a la cocaína. La incapacidad de mantener largos periodos de abstinencia genera constantes recaídas, especialmente en la adicción a cocaína (Sánchez-Hervás y Llorente del Pozo, 2012). A pesar de los avances realizados, las alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de la adicción a cocaína y, en general, a todas las drogas de abuso, no logran producir los cambios necesarios para prevenir la recaída, por lo que las tasas de cumplimiento de los programas muestran unos resultados moderados.

En este sentido, la abstinencia forzada o voluntaria (durante el periodo de desintoxicación) no resuelve el problema de la drogadicción, mientras que la terapia basada en medicación consiste en reemplazar la droga por otra sustancia que, aunque consigue reducir algunos síntomas, supone un elevado coste y tiene una tasa de adherencia al tratamiento muy reducida (Badiani, 2013; Milton y Everitt, 2012b; Sánchez-Hervás y Llorente del Pozo, 2012). Por otra parte, las alternativas conductuales muestran una eficacia moderada que decrece con el paso del tiempo (Milton y Everitt, 2012b).

Por lo tanto, el problema de las altas tasas de recaídas constituye el reto más importante al que deben hacer frente clínicos e investigadores (Sánchez-Hervás y Llorente del Pozo, 2012; Weiss et al., 2001), por lo que la búsqueda de tratamientos eficaces continúa siendo un objetivo prioritario.

6.2. La cocaína y sus formas de consumo.

La cocaína (benzoilmetilecgonina C₁₇H₂₁NO₄) es un alcaloide natural que se extrae de las hojas de dos arbustos de coca (*Erythroxylon coca lam* y *Erythroxylum novogranatense*), originaria de los Andes y del este de Sudamérica (Fernández-Espejo, 2006). Esta droga es un poderoso estimulante del sistema nervioso central (Degenhardt y Hall, 2012) siendo considerado uno de los reforzadores conocidos más potentes (Spronk et al., 2013). Fue empleado en medicina, ya que esta droga muestra un efecto local vasoconstrictor de tipo anestésico, pero su uso fue reduciéndose debido a numerosas investigaciones que la relacionaban con mortalidad y toxicidad (Fernández-Espejo, 2006). Por lo general, la cocaína se consume siguiendo un patrón compulsivo, por el cual se produce una administración de dosis repetidas durante un tiempo limitado seguida de un periodo de abstinencia, de forma que la cantidad consumida aumenta a medida que se desarrolla la dependencia (Crespo-Fernández y Armida, 2007; Panlilio et al., 2005).

Las formas de abuso de cocaína condicionan la farmacocinética, la actividad farmacológica, la toxicidad y el grado de adicción de la droga (Tabla 4). La cocaína se hidroliza en el plasma y se metaboliza en el hígado, teniendo una vida media de eliminación de 1 hora aproximadamente, aunque su vida media de distribución es más corta por lo que sus efectos son de menor duración (Fernández-Espejo, 2006).

Puede consumirse directamente la **hoja de coca** secada al sol, cuya concentración de cocaína es muy variable (0,5-1%) dependiendo del contenido de las hojas, de la preparación usada y de la presencia o ausencia de sustancias alcalinas en la boca del masticador (Lizasoain et al., 2002).

Otra forma de presentación es la **pasta de coca** (denominado también sulfato de cocaína, pasta base o simplemente pasta), que contiene de un 40 a 85% de sulfato de cocaína y cuya vía de administración es fumada (inhalada). Se elabora a partir de la maceración de las hojas con petróleo, ácido sulfúrico u otros productos químicos (alcalinos, amoníaco, etc...) y sirve de base para la elaboración del clorhidrato de cocaína (Lizasoain et al., 2002)

La presentación más común es el **clorhidrato de cocaína**, también denominado **cristales de cocaína**, que puede contener un porcentaje altamente variable de cocaína

(12-80%). Es un polvo que se produce al disolverla en ácido clorhídrico. Es soluble en agua y se administra por vía intranasal (esnifada) o por vía intravenosa. Ambas vías de administración son muy frecuentes en el consumo de esta droga. La absorción de la cocaína por vía intranasal es muy rápida debido a la gran vascularización de la mucosa de la nasofaringe por lo que sus efectos (locuacidad, sensación de energía) también se perciben muy rápidamente (3-5 min.), alcanzando su máximo a los 10-20 min. y duran en total entre 20-40 min. (Fernández-Espejo, 2006; Lizasoain et al., 2002).

La **cocaína base** (denominada coloquialmente *crack*) se obtiene a partir del clorhidrato de cocaína, el cual se disuelve en una solución básica (amoníaco, hidróxido de sodio o bicarbonato sódico) y, a continuación, se filtra el precipitado o se disuelve con éter hasta dejar que se evapore. La concentración de cocaína es de un 30-100% y su manera de administración más común es la fumada (Lizasoain et al., 2002).

Tabla 4. Formas de abuso de la cocaína (tomado de Lizasoain et al, 2002).

TIPO DE SUSTANCIA	Concentración	Vía administración	% en plasma	Velocidad aparición efectos	Concentración máxima	Duración efectos	Desarrollo dependencia
Hojas de coca	0,5-1,5%	Mascado	20-30%	Lenta	60 min.	30-60 min.	NO
Clorhidrato de cocaína	12-75%	Tópica: ocular, genital, intranasal (esnifar)	20-30%	Relativamente rápida	5-10 min.	30-60 min.	SÍ, LARGO PLAZO
Clorhidrato de cocaína	12-75%	Parenteral: endovenosa, subcutanea, intramuscular	100%	Rápida	30-45 seg.	10-20 min.	SÍ, CORTO PLAZO
Pasta de coca	40-85% (sulfato de cocaína)	Fumada	70-80%	Muy rápida	8-10 seg.	5-10 min.	SÍ, CORTO PLAZO
Cocaína base («Crack»)	30-80% (alcaloide cocaína)	Fumada	70-80%	Muy rápida	8-10 seg.	5-10 min.	SÍ, CORTO PLAZO

El tiempo que tarda la droga en llegar al cerebro y producir sus efectos psicoestimulantes va a depender de la vía de administración, aumentando la probabilidad de abuso cuanto antes se produzca este efecto (Fernández-Espejo, 2006).

Las formas de consumo que mayor probabilidad de abuso tienen son la intravenosa y la fumada (Camí y Farré, 2003; Crespo-Fernández y Armida, 2007). Los efectos farmacológicos y psicológicos de la cocaína mediante estas dos vías de administración son muy rápidos (8-10 seg.) y potentes, aunque su duración es breve (10-20 min.). El efecto inmediato de la cocaína a través de estas vías de administración es una intensa sensación de placer (*rush*, “*subidón*”) seguida de una sensación subjetiva

de aumento de energía, habilidades, capacidades y del estado de alerta y una disminución de apetito y del cansancio (Lizasoain et al., 2002).

La administración por vía intravenosa va acompañada por un posterior estado de disforia, irritabilidad y alteraciones gastrointestinales (*crash*) (Ettenberg, 2004), por lo que a veces se combina con heroína (*speed ball*) para evitar estos efectos rebote desagradables (Lizasoain et al., 2002).

El *crack* tiene que pasar primero por los pulmones para, posteriormente, alcanzar la circulación sanguínea (con un tiempo de circulación entre pulmón-cerebro de 6-8 seg.). También tiene efectos inmediatos y de una duración muy breve (menor de 15 min.). Produce una bajada brusca del estado de ánimo, lo que hace que se genere un consumo compulsivo y frecuente. Parece que el *crack* es más adictivo que la cocaína en su forma inyectable o esnifada (Lizasoain et al., 2002).

6.3. Mecanismo de acción de la cocaína.

El mecanismo de acción de la cocaína es inhibir los transportadores de aminas (noradrenalina, dopamina y serotonina), por lo que aumenta la concentración de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica (Ritz et al., 1987) facilitando la unión a sus receptores y aumentando intensamente su acción fisiológica (Caballero, 2005). La cocaína se une al transportador de serotonina (5-HT) aproximadamente cinco veces más potentemente que al transportador de DA, y al transportador de noradrenalina (NA) aproximadamente tres veces con menor afinidad que al transportador de DA (White y Kalivas, 1998). Además de inhibir el funcionamiento de los transportadores de aminas, la cocaína también actúa bloqueando los canales de sodio (Tella y Goldberg, 1998). Esta acción disminuye la tasa de despolarización de la membrana, por lo que aumenta el umbral de excitabilidad eléctrica y bloquea efectivamente la conducción nerviosa.

Las propiedades reforzantes agudas de la cocaína, al igual que el resto de psicoestimulantes, dependen de la activación del sistema mesolímbico dopaminérgico (Fernández-Espejo, 2006). Se ha demostrado que la cocaína produce un aumento de los niveles de DA en el ATV y en el NAcc, centro implicado en el control de las recompensas, lo que explica el gran potencial de esta droga en generar efectos placenteros, euforia y adicción (Caballero, 2005; Roberts y Koob, 1982). En cambio, el exceso de NA es responsable de los efectos farmacológicos y de las complicaciones

agudas de la cocaína (elevación de la presión arterial, temblor, sudoración, midriasis, contracción de esfínteres y retraso digestivo) (Lizasoain et al., 2002). La cocaína también actúa inhibiendo la recaptación de 5-HT, implicada junto con la DA, en los efectos reforzantes de la droga (Tella y Goldberg, 1998).

La DA, a nivel mesolímbico, es el neurotransmisor fundamental en el aprendizaje instrumental. Se ha demostrado que con la exposición crónica de cocaína se produce una regulación al alza del sistema del AMP cíclico y una alteración de la expresión génica en el NAcc (Nestler, 2004; Nestler, 2001; White y Kalivas, 1998), además de cambios morfológicos en el NAcc y CPF (Ballesteros-Yáñez et al., 2007; Robinson et al., 2001). Estas modificaciones en dichas estructuras podrían involucrar cambios en la plasticidad sináptica subyacentes a procesos de memoria y aprendizaje (revisado en Thomas et al., 2008).

Aunque la DA sea el neurotransmisor principal y más estudiado en la participación de los efectos reforzantes de la cocaína, estudios actuales implican a otros neurotransmisores en los efectos producidos por la cocaína (Caballero, 2005). En concreto, los efectos de la cocaína no son completamente evitados tras la administración de antagonistas dopaminérgicos, por lo que la 5-HT puede tener un papel importante en el potencial de abuso de la cocaína (Caballero, 2005). Durante el consumo crónico se produce una situación bifásica en la liberación de DA y de 5-HT en el NAcc (Parsons et al., 1995; Steketee, 2005). Por un lado, durante la autoadministración intravenosa de cocaína se observa un incremento en la liberación de DA (Di Ciano et al., 1995) y 5-HT (Parsons et al., 1995) en el NAcc; en cambio, cuando se finaliza su consumo durante la abstinencia se manifiesta una disminución en los niveles de ambos neurotransmisores en esta misma estructura (Parsons et al., 1995). La hipofunción dopaminérgica que se observa durante la abstinencia se asocia a cambios neuroadaptativos que afectan, principalmente, a las estructuras involucradas en el circuito de la recompensa (Corominas et al., 2007).

Se ha comprobado que otras estructuras cerebrales están implicadas en la adicción a cocaína, en mayor o menor medida, en función de la fase de la adicción en la que nos encontremos. En estudios de neuroimagen en humanos, durante la administración aguda de cocaína se produce un aumento de la actividad neuronal en la COF, CPF y corteza cingulada (Breiter et al., 1997). Por el contrario, durante la fase de

abstinencia se observa una disminución en la actividad neuronal en estas estructuras, además de una reducción de los receptores dopaminérgicos D2 en regiones fronto-estriatales (Volkow et al., 1993). Además, se produce una reactivación de estas mismas estructuras, más la activación de la amígdala, durante la exposición a estímulos medioambientales previamente asociados con cocaína (Childress et al., 1999).

También se ha estudiado la importancia de la densidad de receptor D₂ en el estriado en la iniciación o mantenimiento del abuso y dependencia a cocaína. Se ha observado que sujetos dependientes a cocaína desintoxicados muestran una densidad D₂ a nivel estriatal más reducida que sujetos sanos (Volkow et al., 1997; Volkow et al., 1990). Así mismo, estudios desarrollados en primates no humanos, han demostrado que una menor disponibilidad de receptor D₂ estriatal, incrementa la probabilidad de autoadministración de cocaína (Morgan et al., 2002). Por lo tanto, estos estudios sugieren que una disminución de receptores D₂ en el estriado podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de dependencia a cocaína que, además, podría estar asociado a una disminuida sensibilidad a los reforzadores naturales (Volkow et al., 1999; Volkow et al., 2002).

Otro aspecto a tener en cuenta es el hecho de que la exposición repetida de cocaína, además de incrementar la señalización dopaminérgica en CPF, NAcc, amígdala e hipocampo, permite una variedad de cambios en las vías de señalización glutamatérgica (Kalivas y Duffy, 1998; Kalivas, 2004). En este sentido, se ha observado una reducción de los niveles de glutamato (Glu) extrasináptico en el NAcc *core* seguido de la autoadministración de cocaína a largo plazo (Baker et al., 2003; McFarland et al., 2003). Esta reducción proporciona una menor inhibición de los receptores mGluR2/3 situados en terminales glutamatérgicos presinápticos (Moran et al., 2005) y explica el incremento de la transmisión sináptica en respuesta a estímulos asociados a la droga, así como el incremento de Glu en el NAcc seguido de un *priming* de droga en animales en abstinencia. El incremento de glutamato inducido por *priming* de cocaína o por estrés, es bloqueado por la inactivación de la CPF dorsomedial (McFarland et al., 2004; McFarland et al., 2003). También se han encontrado modificaciones en los receptores glutamatérgicos después de un consumo crónico de cocaína. En concreto, se ha observado un aumento del número total de receptores GluR1 después 45 días desde la última sesión de autoadministración de cocaína (Conrad et al., 2008). También se ha encontrado un incremento funcional en receptores carentes de GluR2 en el NAcc

después de la autoadministración de cocaína, asociado a la incubación del *craving* por consumir cocaína (Grimm et al., 2001; Lu et al., 2004). Un incremento en la expresión de receptores AMPA en la membrana sináptica está asociado con un aumento de la fuerza sináptica, en concreto con la potenciación a largo plazo (PLP). Estos hallazgos sugieren un mecanismo dependiente de receptores glutamatérgicos en la neuroplasticidad de la adicción y en la recaída a la droga.

6.4. Cocaína y sensibilización conductual (SC).

Los efectos estimulantes producidos por drogas como la cocaína aumentan con la exposición repetida intermitente de las mismas, conocido este fenómeno como sensibilización comportamental. La sensibilización se presenta en dos estadios diferentes, denominados inducción y expresión (revisado en Pierce, et al., 1997).

La inducción de la sensibilización se define como la secuencia transitoria de eventos moleculares y celulares activados por la administración de psicoestimulantes, que producen determinados cambios en la función neuronal. La expresión consiste en la manifestación de dichas alteraciones celulares a largo plazo, que surgen de la fase de inducción y se percibe como un aumento de la respuesta comportamental (revisado en Pierce et al., 1997). La inducción puede observarse durante la administración repetida de la droga y, posiblemente, uno o dos días después del cese de la administración de la droga. Por el contrario, los cambios encontrados tras varias semanas después de finalizar el tratamiento están asociados con la expresión. La sensibilización conductual se debe a adaptaciones neuronales que podrían estar involucradas en la transición del uso de las drogas de abuso a la adicción (Tanda, 2007).

Durante mucho tiempo, las investigaciones se han centrado en el sistema mesolímbico, principalmente en el ATV, que inerva numerosas estructuras límbicas como el NAcc (Steketee, 2005), y que es fundamental en la sensibilización inducida por el consumo crónico de drogas, principalmente por psicoestimulantes (Corominas et al., 2007). En este sentido, existen datos que apoyan la idea de que el ATV es importante en el inicio de la sensibilización, mientras que el NAcc juega un papel en la expresión de la sensibilización conductual (Brenhouse et al., 2006; Steketee, 2005).

Durante la fase de inducción de la sensibilización, la administración repetida de cocaína provoca un incremento transitorio de los niveles de monoaminas extracelulares

(DA, 5-HT y NA), así como de Glu en el ATV (Parsons et al., 1995; Vanderschuren y Kalivas, 2000). Este aumento transitorio inicial en la liberación de DA se debe a que la administración repetida de cocaína provoca una desensibilización de los autorreceptores D₂ en las neuronas dopaminérgicas del ATV, lo que induce una mayor liberación de DA en el NAcc (Nestler et al., 1990; Striplin y Kalivas, 1992). A su vez, se ha comprobado que la administración de antagonistas D₂ atenúan la expresión de la sensibilización locomotora después de un tratamiento crónico con cocaína (Mattingly et al., 1994), bloquea la preferencia de lugar inducida por cocaína (Nazarian et al., 2004), así como la recaída inducida por cocaína tras la extinción de la conducta de autoadministración (Schenk y Gittings, 2003).

Los receptores D₁ no se expresan en las neuronas dopaminérgicas del ATV, sino que se encuentran en los terminales glutamatérgicos procedentes de la CPF y del tegmento laterodorsal, por lo que participa en la modulación de la liberación de Glu (Fernández-Espejo, 2006). Por lo tanto, tras el consumo de cocaína, la acción de la DA sobre los receptores D₁ presinápticos incrementa la liberación de Glu en el ATV, que a su vez estimula aún más a las neuronas dopaminérgicas del ATV, lo que constituye un ciclo fundamental en la inducción de la sensibilización a psicoestimulantes como la cocaína. Se ha comprobado que la administración de antagonistas o agonistas de dicho receptor anulan o incrementan, respectivamente, la sensibilización a cocaína y amfetamina (Pierce et al., 1996; Vezina, 1996).

En cuanto a la expresión de la sensibilización adquiere mayor importancia el bucle corticoestriatoamigdalino, en el cual participa el NAcc, la CPF, la amígdala y el estriado dorsal (Pierce y Kalivas, 1997). Para que tenga lugar la expresión de la sensibilización es necesaria la activación de proyecciones glutamatérgicas de la CPF al *core* del NAcc, así como una hiperactividad dopaminérgica en el NAcc y en la amígdala. Dado que las proyecciones dopaminérgicas del ATV ejercen un papel inhibitorio en las neuronas glutamatérgicas de la CPF, la pérdida de esta inhibición provoca, a su vez, una disminución del tono inhibitorio por parte de la CPF sobre el NAcc y otras regiones, principalmente la BLA (Fernández-Espejo, 2006; Vanderschuren y Kalivas, 2000) (Figura 8). Por lo tanto, la BLA tiene una mayor actividad glutamatérgica sobre el NAcc, lo que facilitaría el establecimiento de nuevos circuitos neuronales que reforzarían la sensibilización.

El estriado dorsal es una estructura que está implicada en el mantenimiento de los hábitos motores. Se ha demostrado que el tratamiento crónico con cocaína altera la transmisión glutamatérgica en el estriado dorsal, lo cual produce una sobreactivación de receptores AMPA en esta región (Kim et al., 2013; Parikh et al., 2014). Este podría ser un mecanismo importante en el desarrollo y expresión de la sensibilización conductual inducida por cocaína.

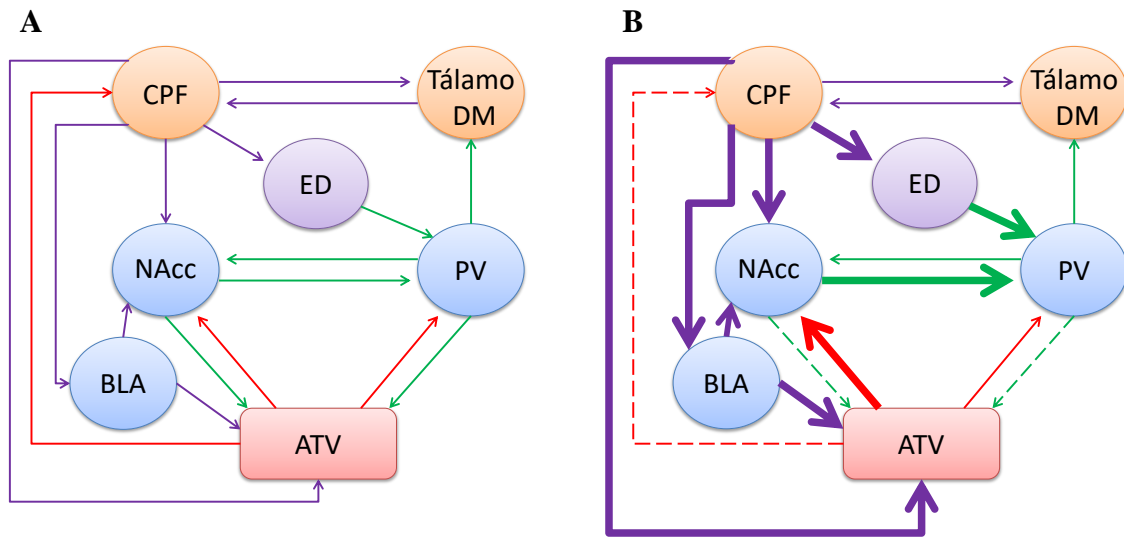


Figura 8. Circuito implicado en la expresión de la sensibilización conductual inducida por cocaína. A) Esquema simplificado de las estructuras que participan en la adicción a cocaína, así como sus principales proyecciones. B) Modificaciones neuroquímicas que suceden después de un consumo crónico de cocaína, responsables de la expresión de la sensibilización conductual. En rojo, proyecciones dopaminérgicas; en púrpura, proyecciones glutamatérgicas; en verde, proyecciones gabaérgicas (las líneas gruesas indican un incremento, mientras que los guiones representan una disminución del neurotransmisor). CPF: Corteza prefrontal; Tálamo DM: Tálamo dorsomedial; ED: Estriado dorsal; ATV: Área Tegmental Ventral; BLA: Amígdala basolateral; PV: Pálido ventral; NAcc: Núcleo Accumbens.

Además de los factores neurobiológicos, los factores ambientales, principalmente el entorno de la administración de la droga, van a modular el desarrollo y la expresión de la sensibilización conductual (Mattson et al., 2008). Se ha observado una mayor sensibilización locomotora inducida por cocaína cuando la administración repetida de la droga se da en un ambiente nuevo, no en la jaula habitual en la que el animal se encuentra estabulado (Mattson et al., 2008). Así mismo, el aprendizaje de las asociaciones entre los efectos de la droga y el contexto en el que se administra produce

una sensibilización específica de contexto, por lo que sólo se expresa en aquel entorno que fue asociado a la droga (Vezina y Leyton, 2009).

Dado que las adaptaciones neuronales que se producen durante la sensibilización conductual son cruciales en el desarrollo y mantenimiento de la conducta adictiva, ésta ha sido ampliamente estudiada en busca de alguna terapia farmacológica capaz de bloquear o reducir estas neuroadaptaciones inducidas por el tratamiento crónico de psicoestimulantes, concretamente de cocaína.

6.5. Contexto, cocaína e hipocampo.

El hipocampo es una estructura cerebral compleja, localizada en el lóbulo temporal medial, importante por el papel que desempeña en la memoria declarativa. En este sentido nos referimos tanto al establecimiento de secuencias temporales en el caso de la memoria episódica (Fortin, Agster y Eichenbaum, 2002) como a la asociación de múltiples estímulos para orientarse en un espacio, en el caso de la memoria espacial (Morris et al., 1982). Además, se ha demostrado la participación del hipocampo en la memoria implícita cuando es necesario establecer asociaciones temporales y/o espaciales complejas. Por lo tanto, es necesario para establecer una asociación entre estímulos separados en el tiempo (e.g., condicionamiento de huella; Gould et al., 1999), para la habituación o sensibilización a un contexto (Honey et al., 2007; Leussis y Bolivar, 2006) y para asociar un evento a un entorno espacial (Holland y Bouton, 1999). La asociación de un evento a un entorno espacial determinado pueden estar relacionadas tanto con experiencias emocionales aversivas (Rudy et al., 2002) como placenteras (Meyers et al., 2003).

El hipocampo es capaz de potenciar la actividad del ATV aunque no mantiene conexiones directas con esta estructura, sino que su acción está mediada por dos vías indirectas en las cuales participan el septum y el NAcc (Floresco et al., 2001; Luo et al., 2011) (Figura 9). Se ha estudiado la importancia del hipocampo en la asociación entre el entorno y el consumo de una droga y la búsqueda de droga inducida por contexto. Lesiones o inactivación funcional del hipocampo dorsal, pero no ventral, perjudican la adquisición y expresión de condicionamiento de lugar preferencial inducido por cocaína (Meyers et al., 2003; Meyers et al., 2006). Además, después de la extinción de la conducta de autoadministración de cocaína, la inactivación del hipocampo dorsal

bloquea la reinstauración de la búsqueda de cocaína inducida por contexto (Fuchs et al., 2005). También se ha observado que la integridad del giro dentado del hipocampo es esencial para establecer una asociación coherente entre el contexto y sus experiencias emocionales, apetitivas y aversivas. De este modo, una lesión en el giro dentado bloquea tanto la preferencia de lugar inducida por cocaína como el miedo condicionado a un contexto (Hernández-Rabaza et al., 2008).

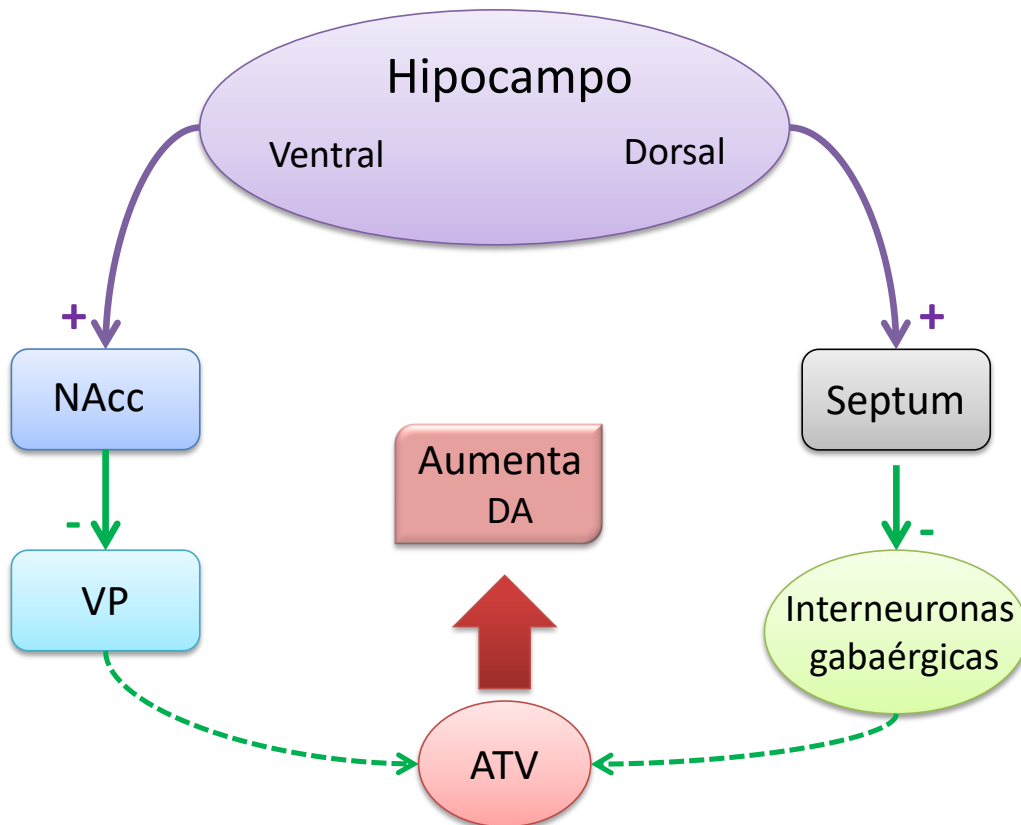


Figura 9. El hipocampo en el circuito de la adicción. La imagen representa los dos circuitos propuestos por los cuales el hipocampo dorsal y ventral podrían modificar la actividad de las neuronas dopaminérgicas del ATV. A través de estas vías eferentes, las proyecciones excitatorias hipocámpales estimularían a estructuras inhibitorias que, por consiguiente, inhiben las proyecciones gabaérgicas sobre el ATV, lo que se traduce en un incremento de la actividad del ATV y de la liberación de DA. En púrpura, proyecciones glutamatérgicas; en verde, proyecciones gabaérgicas. ATV: Área Tegmental Ventral; NAcc: Núcleo Accumbens; VP: Pálido ventral.

La Locomoción Condicionada (LC), consiste en una respuesta conductual asociada al contexto en el que se ha administrado previamente la cocaína y se manifiesta como un incremento en la actividad locomotora al re-exponer al animal al ambiente en el que se produjo previamente el condicionamiento a la droga. Se trata, por lo tanto, de un aprendizaje de tipo pavloviano por el cual una respuesta fisiológica (aumento de la locomoción: RI) producida por los efectos psicoestimulantes de la cocaína (EI) es

asociada a un contexto determinado (EC) que es capaz por si sólo de provocar dicha conducta (locomoción condicionada: RC) en ausencia de la droga.

En este sentido, aquellos animales que han sido tratados durante varios días con drogas de abuso, como la cocaína, muestran un aumento de la locomoción cuando son reexpuestos al contexto en el que condicionaron sin presencia de la droga (Hotsenpiller y Wolf, 2002). Esta respuesta, como ya se ha dicho, depende de un condicionamiento clásico o pavloviano de tipo contextual, en el cual es necesario reconocer un espacio que ha sido previamente asociado a la cocaína. Por lo tanto, la LC como respuesta aprendida supone la participación de circuitos de memoria explícita de base hipocampal, mientras que la expresión de la activación locomotora es dependiente de la participación del NAcc (Singer et al., 2016).

7. LAS N-ACILETANOLAMINAS (NAEs)

7.1. Biosíntesis y degradación de las NAEs.

La palmitoiletanolamida (PEA) es un transmisor lipídico endógeno que pertenece a la familia de las N-aciletanolaminas (NAEs), al igual que la anandamida (AEA) y la oleiletanolamida (OEA). Las NAEs son un grupo de mediadores que no se almacenan en vesículas, debido a su estructura lipídica, sino que se sintetizan a demanda en respuesta a diferentes estímulos en el sistema nervioso central y en otros tejidos periféricos en mamíferos (Hansen, 2010; Piomelli, 2003; Fernando Rodríguez de Fonseca et al., 2005).

Se han propuesto varias vías de síntesis de NAEs (Figura 10). La más estudiada es la que implica a una N-aciltransferasa (NAT) dependiente de Ca^{2+} y AMPcíclico que transfiere un ácido graso desde la posición *sn*-1 de la fosfatidilcolina (PC, del inglés *phosphatidylcholine*) al grupo amino libre de la fosfatidiletanolamina (PE), formando así el precursor N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE). Este NAPE tras la transformación por una fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD) produce el incremento de NAEs (Cadas et al., 1996) (Figura 11). Esta enzima es la responsable de la síntesis de OEA, PEA y AEA a partir de diferentes precursores (Okamoto et al., 2004).

Además de esta vía de síntesis para las NAEs existen otras alternativas en las cuales participan otras enzimas diferentes. Una de ellas se produce mediante la actividad de una lipasa NAPE selectiva llamada $\alpha\beta$ Hidrolasa-4 ($\alpha\beta$ H4) (Simon y Cravatt, 2006). Esta enzima se expresa abundantemente en el sistema nervioso y realizaría la doble desacilación de NAPEs para formar glicerofosfo-NAEs (GP-NAEs) (también llamadas Lisofosfo-NAEs) que tras la acción de otras fosfodiesterasas se convertirían en NAEs. Recientemente, se ha identificado la glicerofosfodiesterasa GDE1 como una enzima de membrana que también presenta actividad fosfodiesterasa GP-NAE (Simon y Cravatt, 2008), así como la glicerofosfodiesterasa GDE4 que podría actuar como una lisofosfolipasa D, hidrolizando glicerofosfo-NAEs para producir NAEs (Tsuboi et al., 2015).

Otra vía de síntesis propuesta sería la hidrólisis de NAPE a N-acil-liso-PE (Liso-NAPE), catalizada por la enzima fosfolipasa A_2 (PLP A_2), seguida de la ruptura de Liso-NAPE a NAEs, catalizada por una lisofosfolipasa D (liso-PLD) (Sun et al., 2004).

También se ha comprobado la actividad de una fosfolipasa-C (PLC) en la síntesis de AEA, pero no en el resto de NAEs (Liu et al., 2006).

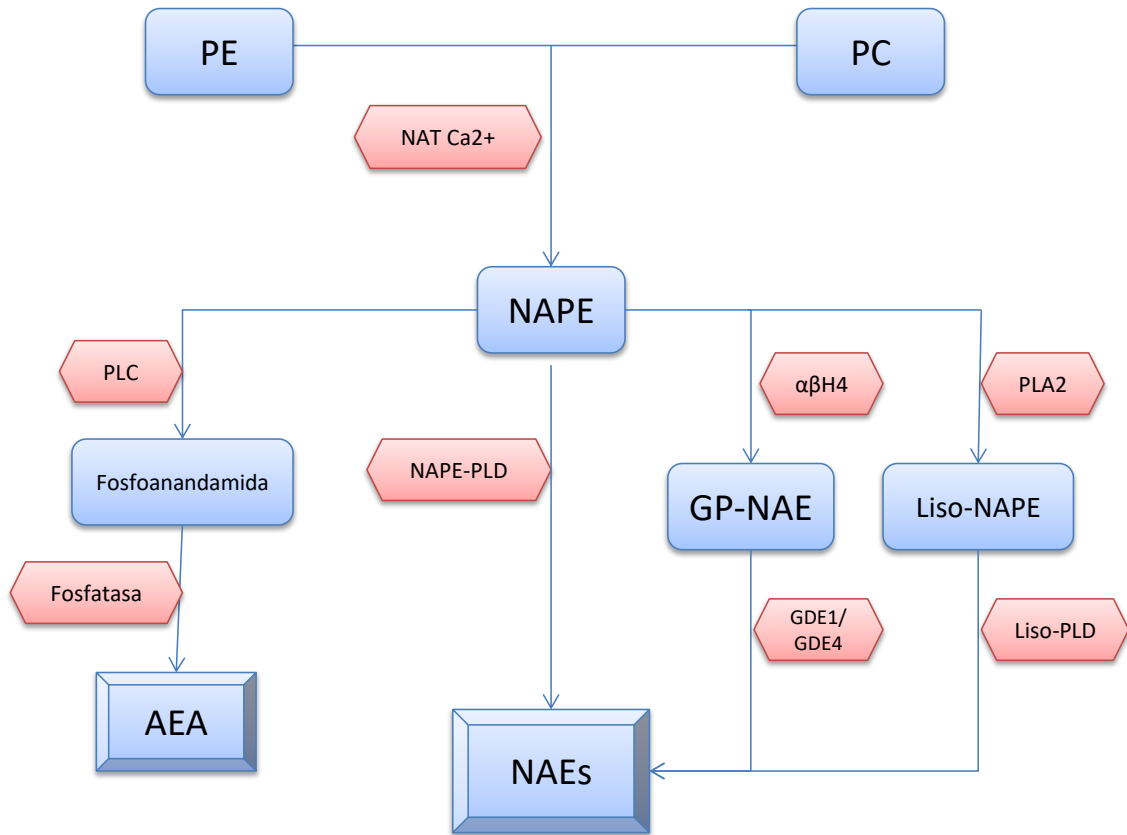


Figura 10. Vías de síntesis de las N-Aciletanolaminas. PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; NAT Ca²⁺: N-aciltransferasa dependiente de calcio; NAPE: N-acilfosfatidiletanolamina; NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de NAPE; NAEs: N-Aciletanolaminas; AEA: anandamida; PLC: fosfolipasa-C; αβH4: αβHidrolasa-4; GP-NAEs: glicerofosfo-NAEs; GDE: glicerofosfodiesterasa; PLA2: fosfolipasa A₂; Liso-NAPE: N-acil-liso-fosfatidiletanolamina; Liso-PLD: lisofosfolipasa D.

Las NAEs son degradadas mediante hidrólisis a través de dos enzimas, la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la *N*-aciletanolamina hidrolizante ácido amidasa (NAAA) (Muccioli, 2010; Ueda et al., 2000). FAAH y NAAA tienen diferentes propiedades catalíticas y sustratos específicos (Ueda et al., 2000). FAAH es una serina hidrolasa que es activa en pH neutro y básico, y tiene mayor actividad para AEA; mientras que NAAA es una cisteína amidasa activa en pH ácido e inactiva en pH básico, y es más eficaz para hidrolizar PEA (Ueda et al., 2000). Además, se ha comprobado que la actividad de la FAAH en diferentes regiones cerebrales (cerebelo y sustancia gris periacueductal) parece mostrar cambios temporales durante los ciclos de luz-oscuridad, disminuyendo su actividad durante los periodos de oscuridad (Glaser y Kaczocha,

2009). Así mismo, se han observado variaciones diurnas en los niveles de OEA y PEA en el cerebro (Murillo-Rodriguez et al., 2006).

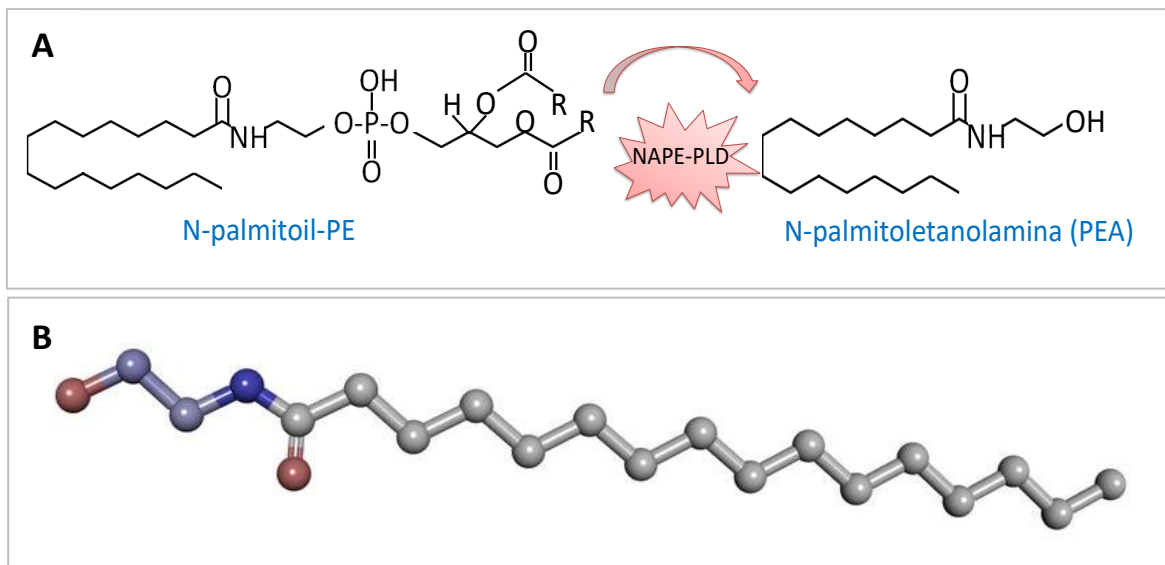


Figura 11. A: Estructura química de la molécula de PEA y de su molécula precursora. La molécula de PEA es sintetizada a partir de su precursor N-palmitoil-PE mediante la acción de la enzima NAPE-PLD. N-palmitoil-PE: N-palmitoil-fosfatidiletanolamina; NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de NAPE; PEA: N-palmitoiletanolamina. **B:** Modelo de la molécula de PEA en barras y esferas. Azul: nitrógeno; rojo: oxígeno; gris: carbono.

7.2. Receptores.

AEA es un mensajero retrógrado que actúa sobre los receptores cannabinoides clásicos, el receptor presináptico cannabinoide tipo 1 (CB1) (Harkany et al., 2008) y el receptor tipo 2 (CB2) (Gonsiorek et al., 2000). Además, numerosos estudios demuestran que algunos efectos de la AEA se producen a través de la activación directa del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) (Zygmunt et al., 1999) y del receptor nuclear proliferador de peroxisoma alpha (PPAR α) (Sun et al., 2006) y gamma (PPAR γ) (Bouaboula et al., 2005).

PEA y OEA ejercen sus efectos a través del receptor nuclear PPAR α (Lo Verme et al., 2005), sobre el receptor TRPV1 y sobre dos receptores huérfanos acoplados a proteína G (GPR 55 y GPR 119) (Godlewski et al., 2009; Hansen, 2010). A pesar de no ser un ligando directo de los receptores CB1 y CB2, PEA puede estar actuando de forma indirecta sobre dichos receptores, ya que los efectos anti-inflamatorios y antinociceptivos de PEA, entre otros, se han visto bloqueados con la administración de antagonistas CB1 (Borrelli et al., 2015; Costa et al., 2008) y CB2 (Borrelli et al., 2015;

Calignano et al., 1998; Costa et al., 2008). Las acciones de PEA a través de los receptores CB, parece deberse a que compite con AEA por la hidrólisis de FAAH, produciéndose así un incremento en los niveles de AEA, la cual activaría los receptores CB1 y CB2 (revisado en Re et al., 2007). Considerando que AEA es también un agonista del receptor TRPV1, algunos efectos de PEA podrían estar mediados por este mismo mecanismo (Ho et al., 2008). Un estudio mostró que PEA puede producir vasodilatación inducida por AEA a través de este mecanismo (Ho et al., 2008; Zygmunt et al., 1999). Además, PEA podría actuar como un modulador alostérico aumentando la capacidad de unión de AEA a TRPV1 (Ho et al., 2008).

7.3. Efectos producidos por PEA.

OEA ha demostrado estar implicada en la regulación de la ingesta y el metabolismo lipídico, de modo que la administración exógena de esta NAE reduce la ingesta y el peso corporal, efecto mediado por el receptor PPAR α (Fu et al., 2003; Guzmán et al., 2004; Lo Verme et al., 2005; Rodríguez de Fonseca et al., 2001). OEA y PEA han demostrado tener un efecto anti-inflamatorio y analgésico, mediados también por el receptor PPAR α (Lo Verme et al., 2006; Suardíaz et al., 2007), aunque existen estudios que demuestran la participación de los receptores CB1 y CB2 en los efectos antinociceptivos (Calignano et al., 1998; Costa et al., 2008) y anti-inflamatorios de PEA (Borrelli et al., 2015; Conti et al., 2002) (Tabla 5). Se ha comprobado, además, que la administración exógena de PEA produce un efecto protector mediado por el receptor TRPV1 en un modelo experimental de dermatitis alérgica de contacto (Petrosino et al., 2010) y es capaz de reducir la discapacidad motora, acompañado de un efecto anti-inflamatorio y neuroprotector en un modelo animal de esclerosis múltiple (Loría et al., 2008; Rahimi et al., 2015). Estudios recientes han mostrado la eficacia del tratamiento crónico con PEA en reducir la percepción de la intensidad del dolor en pacientes diagnosticados de dolor crónico y/o dolor neuropático (Gatti et al., 2012; Paladini et al., 2016).

Tanto OEA como PEA han mostrado tener un importante papel neuroprotector actuando sobre PPAR α (Lombardi et al., 2007; Scuderi et al., 2014; Sun et al., 2007) (Tabla 5). De acuerdo con esto, en un modelo animal de ansiedad/depresión inducido por el tratamiento crónico con corticosterona, la administración de PEA fue capaz de impedir la reducción de proliferación hipocampal y la reducción de densidad dendrítica,

además de producir un incremento en la expresión de BDNF (Crupi et al., 2013). También se ha observado el efecto de PEA como neuroprotector y su capacidad para revertir los déficits motores en un modelo animal de Parkinson, demostrándose que estos efectos son dependientes del receptor PPAR α (Esposito et al., 2012).

Distintos estudios han demostrado que la administración i.p. de OEA (Campolongo et al., 2009) y la administración de un inhibidor de la FAAH (Mazzola et al., 2009) pueden incrementar la consolidación de la memoria en ratas, efecto dependiente del receptor PPAR α . OEA puede activar PPAR α en el sistema periférico y la señal podría alcanzar el cerebro a través del nervio vago, que activaría el núcleo del tracto solitario y de esta forma estimularía la transmisión noradrenérgica en la BLA (Campolongo et al., 2009).

Tabla 5. Principales efectos mediados por OEA y PEA, así como los receptores implicados en cada proceso.

Implicación funcional	PEA/OEA	Receptor	Referencias
Reduce la ingesta y aumenta el metabolismo lipídico.	OEA	PPAR α	Fu et al., 2003; Guzmán et al., 2004; Lo Verme et al., 2005; Rodríguez de Fonseca et al., 2001
Efecto anti-inflamatorio y antinociceptivo	OEA y PEA PEA	PPAR α CB1 y CB2	Lo Verme et al., 2006; Suardfáz et al., 2007 Calignano et al., 1998; Costa et al., 2008; Borrelli et al., 2015; Conti et al., 2002
Neuroprotector	OEA y PEA	PPAR α	Lombardi et al., 2007; Scuderi et al., 2014; Sun et al., 2007; Crupi et al., 2013; Esposito et al., 2012
Incrementa la consolidación de la memoria	OEA	PPAR α	Campolongo et al., 2009; Mazzola et al., 2009
Efectos antidepresivos y ansiolíticos	PEA	-	Crupi et al., 2013; Guida et al., 2015; Yu et al., 2011
Bloquea la activación de neuronas dopaminérgicas en ATV y NAcc inducida por nicotina	OEA y PEA	PPAR α	Mascia et al., 2011; Melis et al., 2008
Reduce el consumo de alcohol, la recaída por señal y los síntomas de abstinencia	OEA	PPAR α	Bilbao et al., 2015
Bloqueo de la sensibilización conductual y del condicionamiento de lugar preferente (CLP) inducido por cocaína	OEA	-	Bilbao et al., 2013

Numerosas evidencias científicas han destacado la implicación del sistema endocannabinoide en los trastornos emocionales (Rodríguez Bambico et al., 2009).



Estudios preclínicos empleando modelos animales de depresión y ansiedad han demostrado que mediante la administración de agonistas del receptor CB1 o antagonistas de la enzima FAAH se pueden inducir efectos antidepresivos (Rodríguez Bambico et al., 2009). Otros trabajos más recientes han apoyado la idea de que la PEA puede facilitar efectos antidepresivos y ansiolíticos (Coppola y Mondola, 2014; Crupi et al., 2013; Guida et al., 2015; Yu et al., 2011). En cuanto a los efectos antidepresivos, la administración exógena de PEA de forma crónica produce una reducción del tiempo de inmovilidad tanto en el test de suspensión de la cola (Guida et al., 2015; Yu et al., 2011) como en el test de natación forzada sin afectar a la actividad exploratoria (Crupi et al., 2013; Yu et al., 2011), así como una mejora en la tarea de reconocimiento de objetos en un modelo animal de dolor crónico (Guida et al., 2015). Además, la administración crónica de PEA también ha mostrado efectos ansiolíticos en distintos modelos animales de ansiedad, como el laberinto elevado en cruz (aumentando el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos), la prueba de campo abierto (incrementando el tiempo de permanencia en el centro del aparato y el número de cruces realizados) y el test de supresión de la ingesta inducida por novedad (disminuyendo la latencia de ingesta) (Crupi et al., 2013).

Respecto a la implicación de las NAEs sobre procesos adictivos, investigaciones previas han demostrado que distintas drogas de abuso, como la cocaína, pueden alterar los niveles de OEA y PEA en distintas estructuras cerebrales (Bystrowska et al., 2014). En concreto, se ha observado un incremento de ambas NAEs, OEA y PEA en la CPF, el hipocampo y el cuerpo estriado dorsal después de 14 días de autoadministración de cocaína, así como un incremento en estas estructuras, excepto en el estriado dorsal, tras un proceso de extinción (Bystrowska et al., 2014). Estudios desarrollados con humanos, han revelado que pacientes en abstinencia de consumo de cocaína muestran mayores niveles en plasma de PEA y OEA comparado con sujetos que nunca han consumido drogas (Pavón et al., 2013).

Se ha comprobado que la inhibición de FAAH, así como la administración de OEA y PEA, bloquean la activación inducida por nicotina de neuronas dopaminérgicas en ATV y NAcc (Luchicchi et al., 2010; Melis et al., 2008), efectos que son mediados por los receptores CB1 y PPAR α (Luchicchi et al., 2010; Mascia et al., 2011). Recientemente, se ha demostrado que el consumo de alcohol incrementa los niveles endógenos de OEA, lo cual reduce su ingesta, efecto mediado por el receptor PPAR α a

nivel periférico (Bilbao et al., 2015). Además, la administración de OEA es capaz de bloquear la reinstauración de la conducta de búsqueda de alcohol inducida por estímulo, reduciendo la severidad de los síntomas somáticos de la abstinencia (Bilbao et al., 2015). A su vez, la OEA ha demostrado tener un efecto anti-inflamatorio, neuroprotector, antioxidante y antidepresivo en situación de abuso de alcohol (Antón et al., 2016)

En cuanto a la implicación de OEA en la adicción a cocaína, se ha comprobado la capacidad de esta molécula para disminuir la actividad locomotora espontánea y la sensibilización conductual inducida por cocaína, así como bloquear el condicionamiento de lugar preferente (CLP) inducido por cocaína (Bilbao et al., 2013). Estos efectos parecen ser independientes del receptor PPAR α , ya que la OEA es capaz de producir los mismos efectos en ratones KO para dicho receptor (Bilbao et al., 2013). De acuerdo con esto, se ha demostrado que el receptor PPAR α juega un papel inhibitorio en la expresión de la sensibilización conductual inducida por morfina, pero no por cocaína (Fernández-Espejo et al., 2009).

Debido a la escasez de estudios sobre la posible implicación de la PEA en la adicción a cocaína y el mecanismo de acción de esta aciletanolamida es similar al de la OEA, hemos diseñado distintos experimentos con el objetivo de dilucidar el efecto de la PEA tanto en el proceso de SC como en el CLP inducido por cocaína.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo II:

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Cada vez son más los estudios que demuestran la participación de las aciletanolamidas en la regulación de la conducta adictiva a distintas drogas de abuso. Aunque OEA y PEA son dos moléculas similares que comparten las mismas vías de síntesis y degradación así como un mecanismo de acción similar, se dispone de mucha más información sobre el papel de la OEA en la regulación de los procesos adictivos y, en concreto, sobre la adicción a cocaína. En este sentido, sabemos que la OEA es capaz de bloquear la adquisición de LC, SC y CLP tras administraciones repetidas de cocaína, aunque se desconoce el papel específico de la PEA en estos procesos relacionados con la adicción a esta droga de abuso. Por ello, en esta tesis doctoral nos hemos planteado estudiar experimentalmente el posible efecto producido por la administración periférica de PEA tanto en la adquisición como en la expresión de respuestas conductuales aprendidas como la LC, la SC y el CLP inducidas por cocaína, hipotetizando que la administración exógena de PEA es capaz de modular la adquisición y expresión de estas memorias. Para someter a contrastación experimental esta hipótesis, se diseñaron dos bloques experimentales principales que nos permitieron estudiar la capacidad de la PEA para modular la adquisición y/o expresión de la LC y SC (bloque experimental 2), así como su papel en la regulación de la adquisición y/o expresión del CLP (bloque experimental 3). Además, para poder controlar los efectos de la administración exógena de PEA sobre otras conductas y que puedan contribuir a la explicación de los resultados obtenidos en los experimentos previos, se diseñó un primer bloque experimental que nos permitía conocer el grado de afectación neurológica y exploratoria relacionada con la administración de PEA.

A continuación, se presentan los objetivos de esta tesis doctoral ordenados dentro de cada bloque experimental.

1. Primer bloque experimental: Estudiar el efecto de la PEA en la capacidad de respuesta de diferentes reflejos, en la actividad exploratoria y en el grado de ansiedad en ausencia de cocaína.
 - a. Conocer si el tratamiento agudo con PEA modifica la función neurológica, evaluando su posible influencia sobre distintos reflejos sensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora.

- b. Determinar el efecto de la administración de PEA en la conducta exploratoria.
 - c. Estudiar si la administración de PEA ejerce algún efecto ansiolítico/ansiogénico.
2. Segundo bloque experimental: Estudiar el efecto de PEA en la adquisición y en la expresión de la LC y SC inducida por cocaína.
- a. Determinar el efecto de la administración repetida de PEA en la adquisición de la LC y SC inducida por cocaína.
 - b. Conocer el efecto de la administración aguda de PEA en la expresión de la LC y SC inducida por cocaína.
3. Tercer bloque experimental: Evaluar el efecto de PEA en la adquisición y en la expresión del CLP inducido por cocaína.
- a. Analizar el efecto de la administración repetida de PEA en la adquisición del CLP inducido por cocaína.
 - b. Conocer el efecto de la administración aguda de PEA en la expresión del CLP inducido por cocaína previamente adquirido.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo III:

PROCEDIMIENTOS GENERALES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Animales de experimentación.

En todos los experimentos realizados en este trabajo, se emplearon ratones macho de la cepa C57Bl/6J de tres meses de edad con un peso medio de 25-30 gr. (Charles River, Barcelona, España) (Figura 12). Los animales fueron mantenidos en el Estabulario Central de la Universidad de Málaga, en condiciones estándar con un fotoperiodo día-noche de 12 horas (encendido de las luces a las 7:00 a.m.), temperatura constante (20 ± 2 °C) y humedad controlada ($40 \pm 5\%$). Los animales dispusieron de comida (dieta SAFE A04, Panlab, Barcelona, España) y agua *ad libitum* durante el tiempo de duración de los experimentos (Figura 12).



Figura 12. A y B: En las imágenes se muestran las condiciones en las que se mantuvieron estabulados los animales de experimentación. C: Imagen de uno de los ratones de la cepa C57Bl/6J empleados en los experimentos.

Cinco días previos al inicio de las pruebas conductuales, se estabulaba a los ratones en cajas individuales (3,5 x 2,3 cm.) y se manipulaban durante 5 min. diarios para que se adaptaran al experimentador y a las condiciones de la sala experimental. Además, se incluyó una muestra de la superficie de la arena de cada aparato experimental, dependiendo de la prueba que fuese a realizarse, para que el animal se habituara a su textura y color. A partir del tercer día de manipulación, se simulaba el proceso de inyección con un objeto puntiagudo de punta roma, presionando en la zona

peritoneal izquierda y derecha, en la cual los animales recibirían en los días siguientes la inyección intraperitoneal (i.p.) de cocaína.

2. Aspectos éticos.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Málaga (CEUMA: **6-2014-A**) y de acuerdo a la normativa legal vigente: Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (B.O.E. de 8 Noviembre de 2007), y la legislación en materia animal de acuerdo a las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea 2010/63/UE, 90/219/CEE, y Regulación (EC) nº1946/2003.

3. Sala de experimentación.

Las evaluaciones comportamentales se realizaron entre las 8:30 h. y las 16:00 h. en una sala de conducta del Estabulario Central de la Universidad de Málaga habilitada para dicho uso. La luz fue controlada por un luxómetro digital (Testo 540, Lenzkirch, Alemania), empleando una intensidad lumínica moderada diferente en función de la prueba utilizada. En la prueba de campo abierto, la intensidad lumínica era de 70 lux en el centro de cada arena, mientras que en las cajas de condicionamiento de lugar preferencial era de 58 lux en el suelo de cada compartimento y de 75 lux en el corredor central. En el laberinto elevado en cruz la intensidad lumínica era de 77 lux en los brazos cerrados, 96 lux en los brazos abiertos y 90 en el centro, y en el laberinto de hoyos se mantuvo una intensidad lumínica de 73 lux en el centro del aparato. Los ensayos conductuales fueron grabados con una cámara digital (Sony DCR-SX22E, Tokio, Japón) y, posteriormente, se procesaron con el programa informático de registro y análisis de comportamiento (Ethovision XT 5.0., Noldus Information Technology, Waningen, Países Bajos).

4. Pruebas de comportamiento.

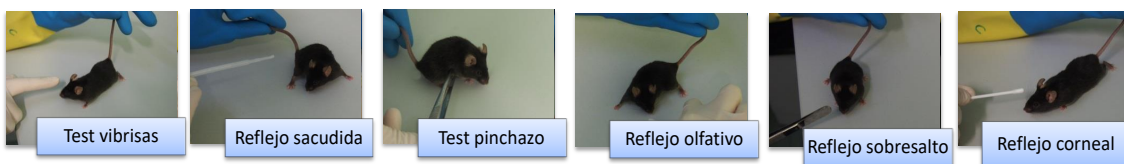
4.1. Evaluaciones neurológicas.

La exploración neurológica se realizó siguiendo la batería desarrollada por Marshall y Teitelbaum (1974), modificada por Björklund et al (1980), y ampliada posteriormente por Bures et al (1983). Esta batería ha sido empleada repetidamente en distintos estudios comportamentales dentro de nuestro grupo de investigación (Castilla-Ortega et al., 2015; Santín et al., 2009). Con esta batería se evaluaron diferentes reflejos somatosensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora a los 5 min. y a los 30 min. de la administración de una solución de vehículo o palmitoiletanolamida (PEA) a dosis de 1 ó 10 mg/kg. Las respuestas emitidas por los animales en cada una de las pruebas se evaluaron de forma observacional, basándose en una escala con tres puntuaciones: 0, ausencia de afectación; 1, afectación débil; 2, afectación grave. A continuación, se detallan las pruebas realizadas (Figura 13).

1. Reflejos somatosensoriales: la evaluación de estos reflejos permitió conocer la capacidad de respuesta del sistema somatosensorial, auditivo y olfativo.
 - Test de las vibrisas: este test consistió en acariciar ligeramente con un dedo las vibrisas, desde una posición posterior al campo visual del animal. Se registró el tiempo de reacción (seg.) de cada animal, mediante la observación del movimiento de retracción de la cabeza.
 - Reflejo de sacudida: se analizó la reacción del animal tras aplicar un soplo de aire cerca de sus oídos mediante un tubo de goma de 2 mm. de diámetro. En condiciones normales el animal responderá con una agitación brusca de la cabeza según el eje antero-posterior de su cuerpo. Se registró el tiempo de respuesta (seg.) de cada animal.
 - Test del pinchazo: esta prueba consistió en aplicar un pequeño pinchazo con unas pinzas metálicas a ambos lados de la superficie lateral del cuerpo del animal. Se observó el movimiento de retracción del animal y se registró el tiempo de respuesta (seg.) ante el pinchazo.
 - Reflejo olfativo: esta prueba consistió en acercar un algodón impregnado en amoníaco en dirección lateral-medial a la nariz del ratón y registrar el tiempo (seg.) que el animal tardaba en retirar la cabeza.

- Reflejo corneal: se sujetó al animal y se estimuló superficialmente la córnea con un bastoncillo de algodón. Se registró el tiempo (seg.) que el animal tardaba en parpadear.
 - Reflejo de sobresalto: se colocó al animal en una superficie plana y se realizó un ruido fuerte e inesperado (palmada). Se evaluó la presencia o ausencia de la respuesta de sobresalto del animal (extensión de los miembros posteriores, flexión de las patas anteriores y arqueamiento del cuerpo).
2. Reflejos motores y de coordinación sensorio-motora: mediante la evaluación de estos reflejos se examinó la integridad funcional de las vías reflejas relacionadas con el control de la coordinación y del movimiento:
- Reflejo de enderezamiento: consistió en voltear al animal sobre su espalda y observar el tiempo (seg.) que tardaba en volver a su posición normal.
 - Reflejo de equilibrio: Se situó al animal mirando hacia abajo en la zona más elevada de una plataforma inclinada 30°. Se registró el tiempo (seg.) que tardaba en girarse y tomar aquella posición que le permitiera mirar hacia arriba.
 - Reflejo de extensión: se mantenía al animal suspendido en el aire por su cola y se le acercaba verticalmente hacia el lateral de una superficie plana sobre la que debía extender sus patas delanteras. Se registró la presencia o ausencia del reflejo de extensión.

1.- Reflejos sensoriales



2.- Reflejos motores y de coordinación sensorio-motora

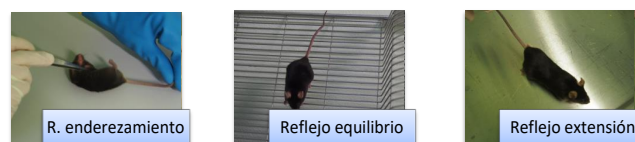


Figura 13. En esta serie de imágenes, se representa cada una de las pruebas neurológicas realizadas empleadas para evaluar la integridad de respuesta de los sistemas sensoriales (superior), motores y de coordinación sensorio-motora (inferior).

4.2. Laberinto de hoyos.

El laberinto de hoyos (*Hole-Board, HB*) consiste en una arena con orificios en el piso, en los cuales los animales pueden introducir el hocico (File y Wardill, 1975). El laberinto de hoyos empleado en nuestros experimentos (*bloque experimental 1*) consistió en un campo abierto de 40 x 40 cm. con 16 hoyos equidistantes (2,5 cm. de diámetro y 3 cm. de profundidad, separados 5,5 cm. entre sí) situados en la zona central del laberinto. La zona periférica medía 6,5 cm. desde las paredes de plexiglás (20 cm. de altura) que rodeaban el aparato (Figura 14). Mayor frecuencia y duración de conductas de introducción del hocico en los hoyos (*head dipping*) son indicadores de menores niveles de ansiedad (Bandoh et al., 2000; Takeda, Tsuji y Matsumiya, 1998).

Cada animal fue situado en el centro del aparato, se le permitió que explorase libremente el laberinto de hoyos durante 5 min. y se grabó la conducta con una cámara digital. Las variables que se evaluaron para estudiar la ansiedad y la exploración en el laberinto fueron las siguientes: locomoción total (cm.), frecuencia de exploración de hoyos o *head dipping* en los hoyos situados en la zona central y periférica del aparato (nº de veces que el ratón introduce el hocico en un hoyo) y frecuencia de exploración vertical o *rearing* (nº de veces que el ratón se sostiene en sus patas traseras mientras que las delanteras pueden estar apoyadas o no en las paredes).

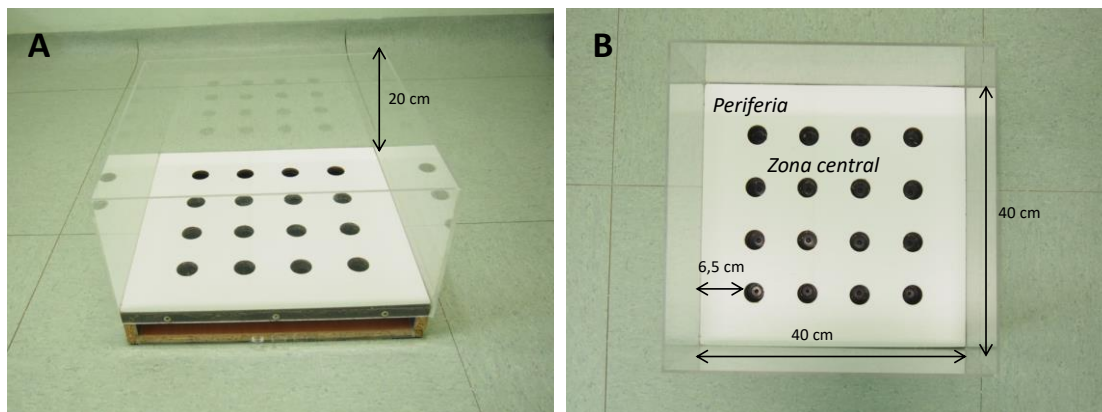


Figura 14. Vista lateral (A) y superior (B) del laberinto de hoyos empleado en nuestros estudios. En los márgenes se indican las dimensiones del mismo.

4.3. Laberinto Elevado en Cruz.

El laberinto elevado en cruz (*Elevated Plus-Maze, EPM*) es una de las pruebas más utilizadas actualmente en modelos animales de conductas relacionadas con la ansiedad (Carobrez y Bertoglio, 2005). Este aparato, en forma de cruz y elevado por encima del suelo, consta de dos brazos abiertos, dos brazos cerrados y un área central. La evaluación comienza colocando al ratón en el centro del aparato y se le permite que lo explore durante un tiempo determinado (Becerra-García, 2007).

La exploración de los brazos abiertos es indicadora de bajos niveles de ansiedad, por lo que a mayor ansiedad existe menor exploración en estos brazos (menor frecuencia de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos) (Pellow et al., 1985; Pellow y File, 1986). Esto se debe al conflicto comportamental que surge entre permanecer en los brazos cerrados, que ofrecen mayor protección aunque menor estimulación, y explorar los brazos abiertos, con mayor cantidad de estímulos pero potencialmente amenazadores (Becerra-García, 2007). Cuando los animales son tratados con fármacos ansiolíticos son capaces de explorar y permanecer durante más tiempo en los brazos abiertos (Carobrez y Bertoglio, 2005; Rodgers y Dalvi, 1997). En los últimos años se han evaluado en el EPM otras conductas como la paralización o inmovilidad completa (*freezing*), defecación, acicalamiento (*grooming*) y exploración vertical (*rearing*), ya que pueden aportar gran información acerca del estado emocional del animal (Rodgers y Dalvi, 1997).

En nuestro estudio (*bloque experimental 1*) hemos empleado un laberinto elevado en cruz, con dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (30 x 10 cm.) con paredes en los brazos cerrados de una altura de 12,5 cm. El laberinto estaba elevado sobre el suelo 57 cm (Figura 15).

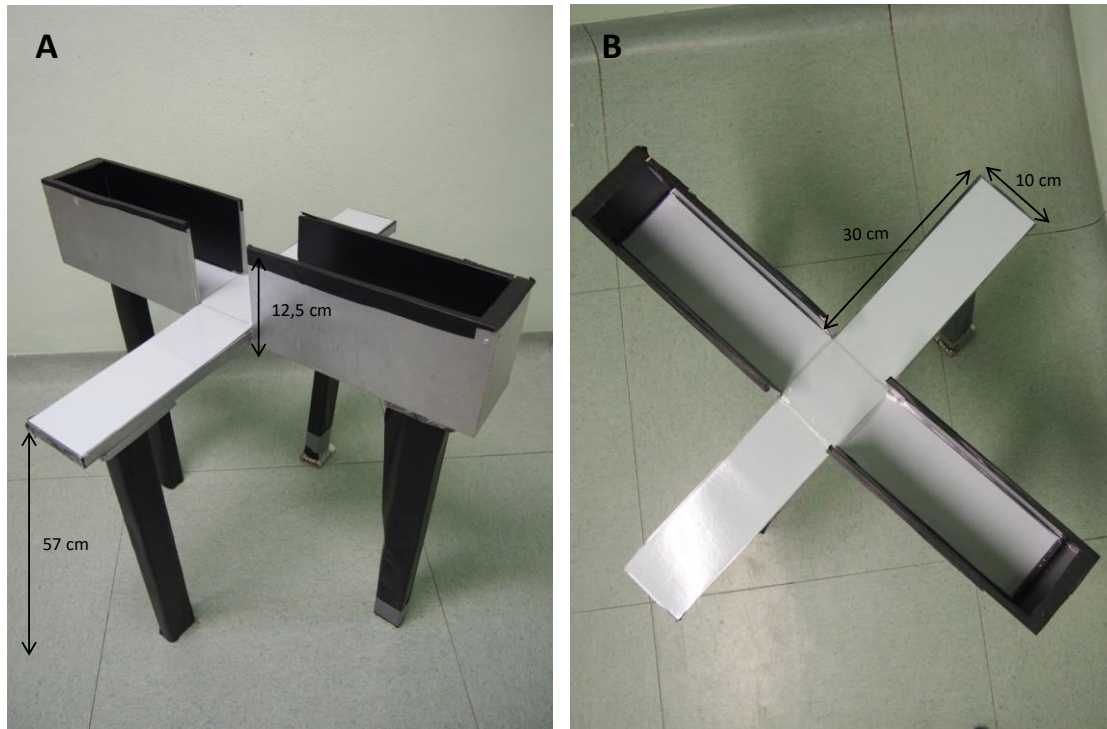


Figura 15. Vista lateral (A) y superior (B) del laberinto elevado en cruz empleado en nuestros estudios. En los márgenes se indican las dimensiones del mismo.

El ensayo consistió en colocar a cada animal en el centro del aparato y su conducta de exploración libre fue grabada con una cámara digital durante un tiempo total de 5 min. Las variables que se evaluaron fueron: tiempo de permanencia en brazos abiertos (seg.), entradas en brazos abiertos (nº), latencia de entrada en uno de los brazos abiertos (seg.), velocidad (cm /seg.), locomoción total (cm.), exploración vertical (nº), acicalamiento (nº), *head-dipping* (nº) y conducta de valoración de riesgo (nº). A continuación, se calculó un índice que refleja la relación entre la actividad exploratoria en las zonas seguras (brazos cerrados) y en las zonas potencialmente peligrosas (brazos abiertos), permitiendo analizar así el grado de ansiedad de los animales (Malleret et al., 1999): tiempo de permanencia en los brazos abiertos / (tiempo de permanencia en brazos abiertos + tiempo de permanencia en brazos cerrados).

4.4. Campo abierto.

Para la medición de la locomoción condicionada y de la sensibilización condicionada (*boque experimental 2*) se utilizó un campo abierto (*Open Field, OF*). Esta prueba fue diseñada por Hall (1936) para el estudio de la emocionalidad en ratas midiendo la defecación y la orina, así como la actividad locomotora. Desde entonces se ha convertido en una de las pruebas más populares en prácticamente todos los estudios comportamentales para evaluar el patrón exploratorio de los roedores en diferentes condiciones experimentales.

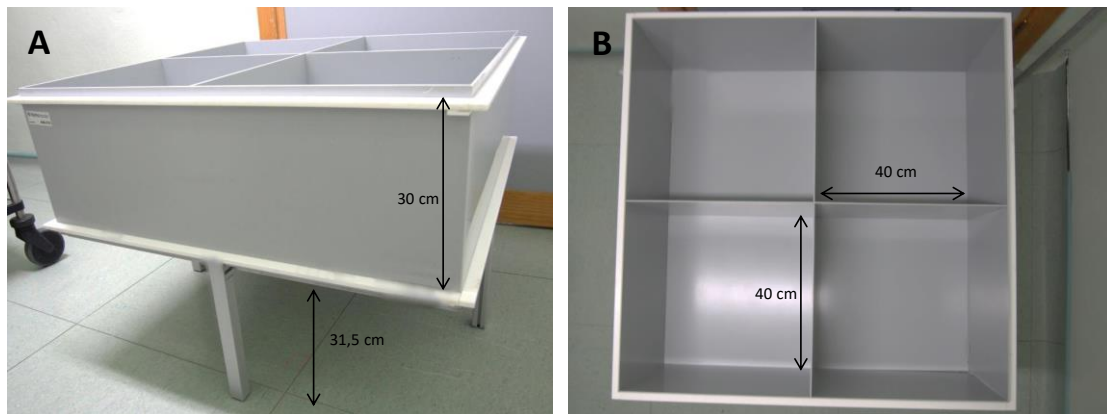


Figura 16. Vista lateral (A) y superior (B) del campo abierto empleado en nuestros estudios. En los márgenes se indican las dimensiones de la misma.

En nuestro estudio se empleó un campo abierto con cuatro arenas cuadradas, cada una de ellas de dimensiones de 40 x 40 cm. (Figura 16). Debido a que los ratones de esta cepa son de color oscuro, para que fuese posible el registro conductual, se empleó una arena de color gris que permitió suficiente contraste en el momento de registrar el movimiento del animal con Ethovision. En todos los ensayos, se situó a cada animal en el centro de cada arena tras la administración del tratamiento correspondiente y se les permitió que la exploraran libremente durante 30 min. La variable dependiente registrada en los estudios de sensibilización fue la distancia recorrida (cm.).

4.5. Condicionamiento de Lugar Preferencial.

El condicionamiento de lugar preferencial (*Conditioned Place Preference, CPP*) es una conducta aprendida de carácter asociativo presente en la mayoría de los vertebrados, incluidos los humanos. El CLP tiene lugar cuando un sujeto prefiere un lugar más que otro porque ha sido previamente emparejado con eventos reforzantes. El paradigma de condicionamiento contextual se ha empleado tanto para estudiar los efectos reforzantes de estímulos naturales y farmacológicos (drogas de abuso) mediante CLP (Huston, Silva, Topic y Müller, 2013), como para evaluar la conducta de evitación o rechazo ante estímulos desagradables mediante condicionamiento de aversión de lugar (CAL) (Tenk, Kavaliers y Ossenkopp, 2005).

En este estudio (*bloque experimental 3*) se emplearon tres cajas de CLP (Panlab, Barcelona, España) para poder testar a la vez a 3 animales durante el precondicionamiento y la prueba de preferencia, y a 6 animales durante la fase de condicionamiento, evitando de esta forma que el experimento se llevase a cabo en diferente franja horaria. Cada caja consta de una cámara de plexiglás con dos compartimentos del mismo tamaño (20 x 18 x 25 cm.), comunicados por un pasillo rectangular (20 x 7 x 25 cm.) translúcido mediante puertas de guillotina. Los compartimentos fueron diferenciados por los diferentes motivos en las paredes y la distribución espacial de polígonos en algunas de sus esquinas (pirámide y prisma de base triangular). Uno de ellos tenía paredes rayadas de color blanco-gris y el otro compartimento tenía paredes punteadas de color gris-negro (Figura 17). La prueba de CLP permite evaluar la cantidad de tiempo que pasa el animal en el compartimento que ha sido asociado a los efectos de la droga o en el compartimento emparejado con la administración de la solución vehículo. El compartimento asociado a la droga ha adquirido propiedades reforzantes si el animal demuestra preferencia por este lugar frente al asociado con el vehículo (Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2009; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

Las variables dependientes registradas en todos los ensayos fueron: la distancia recorrida (cm.) y el tiempo de permanencia (seg.) en cada compartimento. El registro y análisis se realizó mediante el sistema informatizado de análisis de conducta Ethovision. La puntuación de CLP obtenida en la prueba de preferencia se calcula mediante la siguiente fórmula: tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la droga

(CS+) restado al tiempo de permanencia en el compartimento asociado a solución salina (CS-).

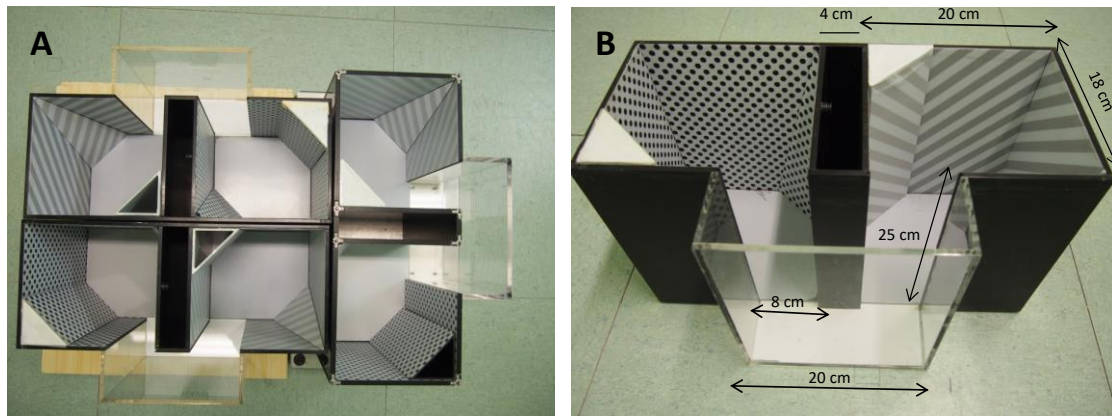


Figura 17. Vista superior (A) y lateral (B) de las cajas de condicionamiento de lugar preferencial empleadas en nuestros estudios. En los márgenes se indican las dimensiones de la misma.

5. Análisis estadísticos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático de análisis de datos STATISTICA 7.1 (Stat Soft, Inc, Oklahoma, USA). Los datos obtenidos en las diferentes pruebas se analizaron con una t-Student para muestras dependientes, análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y ANOVA de medidas repetidas en función de la variable que se estuviese analizando y del diseño experimental empleado. Cuando el resultado de los ANOVAs fue estadísticamente significativo se aplicó la prueba de significación a posteriori (post-hoc) de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD). En todos los casos, sólo se consideraron estadísticamente significativas las probabilidades iguales o menores a 0,05. Las probabilidades mayores a 0,05 no se consideraron significativas (n.s.).

6. Tratamientos.

Los compuestos farmacológicos empleados en los distintos experimentos fueron los siguientes: **clorhidrato de cocaína** (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad y Consumo) diluido en suero salino (NaCl 0,9%), a dosis de 20 mg/kg administrada por vía i.p., excepto en pruebas en las que se administró un “*priming*” agudo, a dosis de 10 mg/kg; la **Palmitoiletanolamida** (PEA),

N-(2-Hidroxiethyl) hexadecanamida (Tocris Bioscience, Bristol, UK) fue diluida en 5% de Tween-80 y 95% de suero salino. Se emplearon dosis de 1 y 10 mg/kg, administradas por vía i.p. 30 min. previamente a cada ensayo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo IV:

EFECTO DE LA PALMITOILETANOLAMIDA EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA Y EN LAS PRUEBAS NEUROLÓGICAS EN AUSENCIA DE COCAÍNA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Introducción.

La exploración neurológica es necesaria para conocer el estado del sistema nervioso y la capacidad de respuesta de los diferentes reflejos sensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora. En nuestro estudio se sometieron a los animales a diferentes test neurológicos que permitiesen evaluar el grado de afectación de dichos reflejos tras la administración aguda de PEA a distintas dosis (1 ó 10 mg/kg) en comparación a animales que fueron tratados con vehículo, tanto a los 5 como a los 30 min. desde su administración.

Además, se evaluó el efecto del tratamiento agudo de PEA en la actividad exploratoria de los animales en dos pruebas comportamentales, las cuales implican demandas diferentes. En primer lugar, se expuso a los animales al laberinto de hoyos (descrito en el apartado 4.2. de *Procedimientos generales*), para poder evaluar la actividad exploratoria de los animales así como el grado de ansiedad, ya que, tanto la exploración en las zonas centrales del aparato como la frecuencia y duración de las conductas de introducción del hocico en los hoyos son indicadores de menores niveles de ansiedad. En segundo lugar, se empleó la prueba del laberinto elevado en cruz (descritas en el apartado 4.3. de *Procedimientos generales*), para estudiar si la administración de PEA inducía cambios en el patrón exploratorio normal de los animales que pudiera ser indicativo de cambios emocionales relacionados con la ansiedad. De este modo, el tiempo transcurrido en las zonas seguras del aparato (brazos cerrados) será indicativo de mayores niveles de ansiedad, mientras que mayor tiempo de permanencia en las zonas potencialmente peligrosas (brazos abiertos) revelará menor grado de ansiedad. Además del tiempo de permanencia en los distintos brazos del aparato, se registraron y evaluaron diferentes conductas (exploración vertical, acicalamiento, valoración de riesgo y *head-dipping*) que pueden indicar un patrón exploratorio normal o alterado debido a la administración previa de PEA.

Por lo tanto, en este primer apartado experimental se pretende conocer si el tratamiento agudo de PEA a dosis de 1 ó 10 mg/kg modifica la respuesta de los animales en una batería de test neurológicos que evalúan reflejos sensoriales y motores, si altera la conducta exploratoria y si ejerce algún efecto ansiolítico/ansiogénico.

2. Material y métodos.

2.1. Procedimiento conductual

La evaluación del efecto de la administración aguda de PEA en las pruebas neurológicas y en la actividad exploratoria se llevó a cabo durante tres días consecutivos.

Para evaluar el efecto de la administración aguda de PEA en la actividad exploratoria se emplearon dos pruebas de comportamiento distintas, el laberinto de hoyos y el laberinto elevado en cruz (ver apartado *Procedimientos generales*). Se emplearon un total de 41 ratones divididos aleatoriamente en 3 grupos experimentales: vehículo (n= 13), PEA a dosis de 1 mg/kg (n= 13) y PEA a dosis de 10 mg/kg (n= 15). El primer día de la evaluación conductual los animales fueron sometidos a la prueba del laberinto de hoyos (descrito en el apartado 4.2 de *Pruebas de comportamiento*). El procedimiento consistió en una sesión en la que cada animal fue situado en el centro del aparato y se le permitió que lo explorase libremente durante un tiempo total de 5 min. Las variables que se registraron para evaluar la ansiedad y la exploración fueron las siguientes: locomoción periférica y central (distancia recorrida; cm.), exploración de hoyos en la zona central y periférica del aparato (frecuencia) y exploración vertical (frecuencia). La locomoción y la frecuencia de exploración de hoyos en la zona central y periférica del aparato fueron analizadas mediante el programa informático Ethovision, mientras que la conducta de exploración vertical se cuantificó observacionalmente anotando de forma manual cada vez que el animal realizaba dicha conducta.

El segundo día todos los animales fueron testados en el laberinto elevado en cruz (descrito en el apartado 4.3. de *Pruebas de comportamiento*). Se introdujo cada animal en el centro del aparato y se le permitió que lo explorase libremente durante 5 min. Las variables dependientes que se evaluaron fueron: tiempo de permanencia en brazos abiertos (seg.), entradas en brazos abiertos (n°), latencia de entrada en brazos abiertos (seg.) (tiempo que tarda cada animal en entrar por primera vez en un brazo abierto), velocidad (cm./seg.), locomoción total (cm.), exploración vertical (n°), acicalamiento (n°), *head-dipping* (n°) y conducta de valoración de riesgo (n°). La conducta ansiosa fue evaluada principalmente mediante la comparación de la actividad mostrada por los animales en los brazos abiertos con respecto a los brazos cerrados, empleando el

siguiente índice de ansiedad = tiempo de permanencia en los brazos abiertos / tiempo de permanencia en brazos abiertos + tiempo de permanencia en brazos cerrados (Malleret et al., 1999; Santín et al., 2009). Cabe destacar que este índice de ansiedad puede fluctuar entre 0 y 1, siendo las puntuaciones cercanas a 0 indicativas de mayor permanencia en las zonas seguras (brazos cerrados) y, por lo tanto, de mayor grado de ansiedad, mientras que las puntuaciones cercanas a 1 indican mayor permanencia en las zonas más ansiogénicas (brazos abiertos). Todas las variables evaluadas fueron registradas y analizadas mediante el programa informático Ethovision, a excepción de las conductas de exploración vertical, acicalamiento, *head-dipping* y valoración de riesgo, las cuales se registraron observacionalmente registrándose de forma manual.

Por último, el tercer día se evaluó el efecto de la PEA sobre diferentes reflejos sensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora, empleando la batería desarrollada por Marshall y Teitelbaum (1974) (ver apartado 4.1. de *Pruebas de comportamiento*). Para realizar las pruebas neurológicas se emplearon 24 ratones, divididos aleatoriamente en tres grupos experimentales: vehículo (n = 9), PEA 1 mg/kg (n = 7) y PEA 10 mg/kg (n = 8). Las diferentes pruebas se llevaron a cabo a los 5 min. y a los 30 min. después de la administración de vehículo o PEA a dosis de 1 ó 10 mg/kg. Las respuestas mostradas por los animales en todos los tests se evaluaron observacionalmente, basándose en una escala con tres posibles puntuaciones: 0, ausencia de afectación; 1, afectación débil; 2, afectación grave.

2.2. Análisis estadísticos.

En la tarea del laberinto de hoyos, la frecuencia de exploración de hoyos en la región periférica y central del laberinto se analizó haciendo uso de un ANOVA de medidas repetidas. Asimismo, la locomoción en ambas regiones del laberinto se analizó mediante el mismo análisis estadístico. La frecuencia de exploración vertical, que se registró sin diferenciar regiones, se analizó aplicando un ANOVA de una vía. El análisis estadístico de las variables dependientes registradas en el laberinto elevado en cruz se realizó aplicando un ANOVA de una vía. Por último, los resultados obtenidos en las pruebas neurológicas fueron analizados mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), comparando el grado de ejecución de los animales pertenecientes a los tres grupos experimentales, a los 5 y 30 min. después de la administración de los tratamientos farmacológicos.

3. Resultados.

3.1. Efecto del tratamiento agudo de PEA en el laberinto de hoyos.

Los resultados estadísticos sobre la frecuencia de exploración de los hoyos revelaron diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento (efecto de “tratamiento”: $F(2, 38)=10,82$; $p\leq 0,001$), de la zona de exploración (efecto de “zona”: $F(1, 38)=118,73$; $p\leq 0,001$), así como de la interacción entre ambas variables (efecto de “zona x tratamiento”: $F(2, 38)=6,31$; $p\leq 0,01$). El análisis post hoc reveló que todos los grupos presentaban mayor frecuencia de exploración de los hoyos en la periferia que en el interior del laberinto ($p\leq 0,05$), observándose una frecuencia de exploración de hoyos en ambas regiones (periferia y centro) significativamente menor en el grupo PEA 10 en comparación con los otros dos grupos tratados ($p\leq 0,05$) (Figura 18).

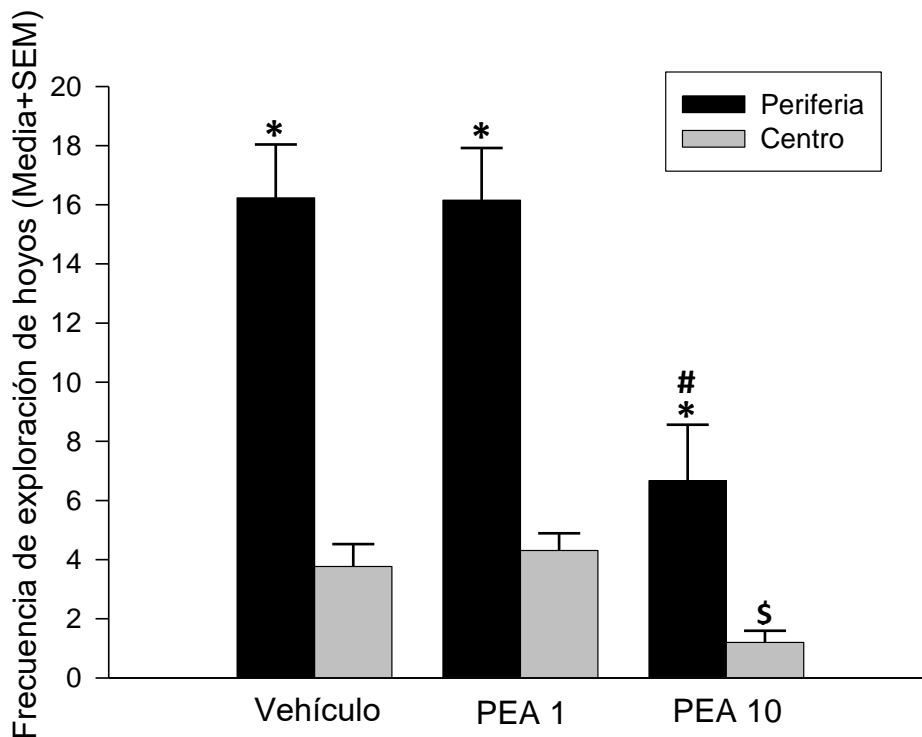


Figura 18. Frecuencia de exploración de hoyos en la periferia y en el centro del laberinto de hoyos. La gráfica representa la frecuencia de exploración de hoyos en la periferia y en el centro del aparato para cada grupo de tratamiento. Todos los animales exhibieron mayor frecuencia de exploración de hoyos en la zona periférica que en la zona central. El grupo tratado con PEA 10 mg/kg presentó una reducción en la exploración de hoyos, tanto en la periferia como en el centro del aparato, respecto a los demás grupos experimentales. *Diferencia estadísticamente significativa respecto a la frecuencia de exploración de hoyos en el centro ($p\leq 0,05$); #Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales en la frecuencia de exploración de hoyos en la periferia ($p\leq 0,05$); §Diferencia significativa

respecto a los grupos experimentales restantes en la frecuencia de exploración de hoyos en el centro ($p \leq 0,05$).

Con respecto al análisis de la frecuencia de exploración vertical, los análisis estadísticos mostraron que los grupos experimentales diferían en esta variable en función del tratamiento recibido (efecto de “tratamiento”: $F(2, 38) = 18,77$; $p \leq 0,001$), siendo el grupo tratado con PEA a dosis de 10 mg/kg el que mostró una menor exploración vertical en comparación con los otros dos grupos ($p \leq 0,05$) (Figura 19).

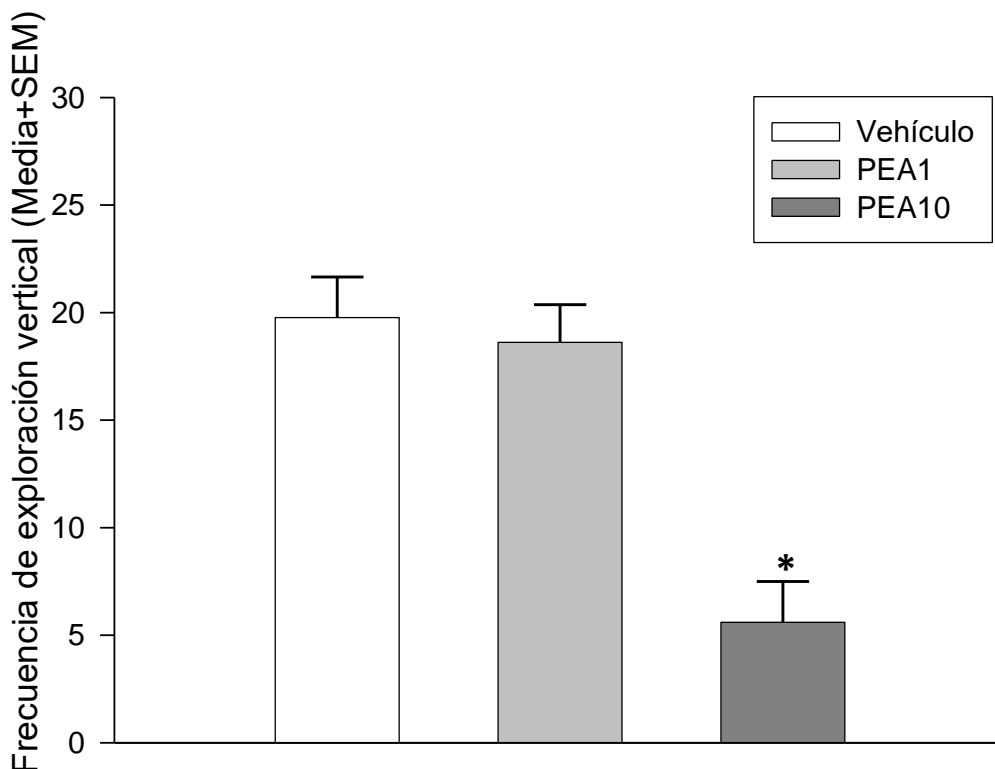


Figura 19. Frecuencia de exploración vertical en el laberinto de hoyos. La gráfica muestra la frecuencia de exploración vertical para cada tratamiento. El tratamiento con PEA 10 mg/kg provocó una reducción de la frecuencia de exploración vertical comparado con los demás grupos experimentales. *Diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros dos grupos experimentales ($p \leq 0,05$).

Por último, el ANOVA de medidas repetidas para la distancia recorrida en el laberinto de hoyos, mostró que los tres grupos restringían su actividad locomotora preferentemente a la región periférica (efecto de “zona”: $F(1, 38) = 43,44$; $p \leq 0,001$). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos causadas por el tratamiento (efecto de “tratamiento”: $F(2, 38) = 12,41$; $p \leq 0,001$), de modo que el grupo tratado con PEA a dosis de 10 mg/kg disminuyó la distancia recorrida tanto en la región central del laberinto como en la periférica con respecto a los otros dos grupos ($p \leq 0,05$) (Figura 20).

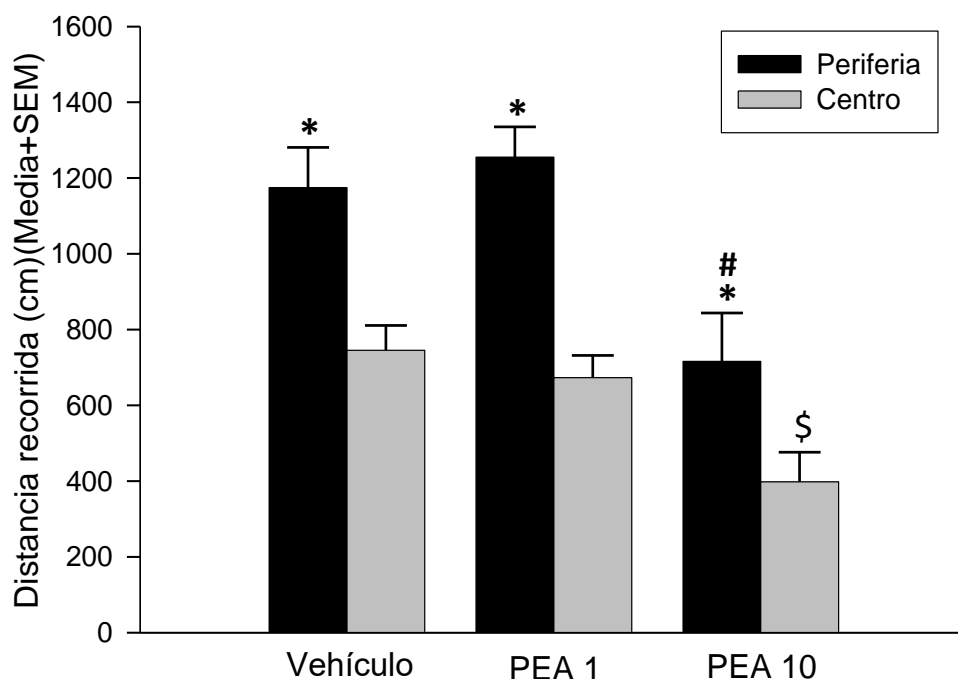


Figura 20. Distancia recorrida en el laberinto de hoyos. La gráfica muestra la distancia recorrida en la zona periférica y central del aparato para cada grupo de tratamiento. Todos los grupos experimentales presentaron mayor distancia recorrida en la periferia que en el centro del aparato. Además, el grupo tratado con PEA 10 mg/kg exhibió menor locomoción en la periferia y en el centro que el resto de los grupos experimentales. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al centro ($p \leq 0,05$); #Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales en la periferia ($p \leq 0,05$); \$Diferencia significativa respecto a los otros dos grupos experimentales en el centro ($p \leq 0,05$).

3.2. Efecto del tratamiento agudo de PEA en el laberinto elevado en cruz.

Los resultados detallados del análisis realizado en todas las variables analizadas en el laberinto elevado en cruz se muestran en la Tabla 6. Los análisis estadísticos indican que la administración de PEA a dosis de 1 y 10 mg/kg, no afecta a la conducta relacionada con la ansiedad en el laberinto elevado en cruz. En este sentido, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=0,36; p>0,05$), en el número de entradas en los brazos abiertos (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=1,39; p>0,05$), en la latencia de entrada a uno de los brazos abiertos (efecto de “tratamiento”: $F(2, 36)=2,49; p>0,05$), ni en el índice de ansiedad (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=0,63; p>0,05$).

Con respecto a las variables de actividad locomotora, el análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas tanto en la distancia total recorrida (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=7,13; p\leq 0,01$) como en la velocidad media (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=7,14; p\leq 0,01$). El análisis post-hoc indicó que el grupo tratado con PEA a dosis de 10 mg/kg recorrió menor distancia y mostró menor velocidad que el resto de grupos experimentales ($p\leq 0,05$).

Con respecto al análisis de las conductas evaluadas en el laberinto elevado en cruz, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la frecuencia de exploración vertical (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=6,09; p\leq 0,01$) siendo el grupo tratado con PEA a dosis de 10 mg/kg el que mostró una exploración vertical reducida respecto a los demás grupos experimentales ($p\leq 0,05$). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la frecuencia con la que presentaban conducta de valoración de riesgo (efecto de “tratamiento”: $F(2, 37)=4,78; p\leq 0,01$), siendo el grupo tratado con PEA 10 mg/kg el que disminuyó ligeramente el número de conductas de valoración de riesgo con respecto al grupo tratado con vehículo ($12,25\pm 0,98$ vs. $15,11\pm 1,12; p\leq 0,05$). Sin embargo, la administración de PEA a dosis de 1 y 10 mg/kg no afectó a la emisión de las conductas de acicalamiento ($F(2, 37)=0,66; p>0,05$) ni de *head-dipping* ($F(2, 37)=1,22; p>0,05$).

Tabla 6. Evaluación conductual en el laberinto elevado en cruz en los distintos grupos experimentales. Resultados expresados como media \pm SEM.

	Vehículo	PEA 1 mg/kg	PEA 10 mg/kg
Tiempo en brazos abiertos (seg.)	41,09 \pm 4,46	39,75 \pm 5,27	35,98 \pm 5,60
Latencia a brazo abierto (seg.)	12,86 \pm 5,40	2,87 \pm 2,65	9,65 \pm 3,44
Entradas brazos abiertos (nº)	12,44 \pm 1,56	10,29 \pm 1,48	10,50 \pm 1,10
Índice de ansiedad	0,17 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02
Velocidad (cm /seg.)	7,74 \pm 0,58	7,29 \pm 0,27	6,85 \pm 0,35 * #
Locomoción total (cm.)	2266,28 \pm 163,76	2329,42 \pm 123,16	1782,42 \pm 123,67*#
Exploración vertical (nº)	10,44 \pm 1,41	14,43 \pm 1,13	11,88 \pm 2,03 * #
Acicalamiento (nº)	1,22 \pm 0,22	1,29 \pm 0,36	2 \pm 0,46
Head-dipping (nº)	10,33 \pm 1,41	12,43 \pm 1,89	10,50 \pm 1,88
Valoración de riesgo (nº)	15,11 \pm 1,12	12,71 \pm 1,13	12,25 \pm 0,98 *

* $p \leq 0,05$, respecto al grupo vehículo; # $p \leq 0,05$, respecto al grupo PEA 1

3.3. Efecto del tratamiento agudo de PEA en las pruebas neurológicas.

En general, los animales tratados con PEA a ambas dosis mostraron una elevada preservación de las funciones neurológicas. No se encontraron diferencias significativas en función del tratamiento en ninguna de las pruebas realizadas, independientemente del momento de la evaluación ($p > 0,05$) (Tabla 7 y 8). Sin embargo, puede apreciarse a nivel cualitativo que, aun no siendo estadísticamente significativa, una ligera afectación en los animales tratados con PEA a dosis de 10 mg/kg en el *test* del pinchazo (H (2, N=24) =2,29; $p > 0,05$), en el reflejo de sobresalto (H (2, N=24) =4,18; $p > 0,05$), reflejo de equilibrio (H (2, N=24) =2,73; $p > 0,05$) y en el de extensión (H (2, N=23) =2,37; $p > 0,05$) a los 30 min. de la administración del tratamiento. El porcentaje de animales dentro de este grupo experimental que mostraron alteración grave a los 30 min. de la administración de PEA a dosis de 10 mg/kg fue de un 37,5% en el test del pinchazo, un 25% en el reflejo de sobresalto y en el reflejo de equilibrio, y un 12,5% en el reflejo de extensión (Tabla 8).

Tabla 7. Exploración neurológica de los animales tratados con vehículo, PEA 1 o PEA 10 mg/kg a los 5 min. de la administración de los distintos tratamientos. Los datos están expresados en porcentaje de animales.

1.- Reflejos somatosensoriales						
Test vibrisas			Reflejo de sacudida			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
Test pinchazo			Reflejo olfativo			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	88,8 %	11,1 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
Reflejo corneal			Reflejo de sobresalto			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	100 %	0 %	0 %	88,8 %	0 %	11,1 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	85,8 %	14,2 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	88,8 %	11,1 %	0 %
2.- Reflejos motores y de coordinación sensorio-motora						
Reflejo de enderezamiento			Reflejo de equilibrio			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	100 %	0 %	0 %	88,8 %	11,1 %	0 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	75 %	25 %	0 %
Reflejo de extensión						
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)		Afectación débil (1)		Alteración grave (2)	
Vehículo	100 %		0 %		0 %	
PEA 1	100 %		0 %		0 %	
PEA 10	100 %		0 %		0 %	

Tabla 8. Exploración neurológica de los animales tratados con vehículo, PEA 1 o PEA 10 mg/kg a los 30 min. de la administración de los distintos tratamientos. Los datos están expresados en porcentaje de animales.

1.- Reflejos somatosensoriales						
Test vibrisas			Reflejo de sacudida			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	75 %	25 %	0 %
Test pinchazo			Reflejo olfativo			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	88,8 %	0 %	11,1 %	100 %	0 %	0 %
PEA 1	85,8 %	14,2 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 10	62,5 %	0 %	37,5 %	100 %	0 %	0 %
Reflejo corneal			Reflejo de sobresalto			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	75 %	0 %	25 %
2.- Reflejos motores y de coordinación sensorio-motora						
Reflejo de enderezamiento			Reflejo de equilibrio			
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)	Ausencia de alteración (0)	Afectación débil (1)	Alteración grave (2)
Vehículo	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
PEA 1	100 %	0 %	0 %	71,5 %	28,5 %	0 %
PEA 10	100 %	0 %	0 %	75 %	0 %	25 %
Reflejo de extensión						
Tratamiento	Ausencia de alteración (0)		Afectación débil (1)		Alteración grave (2)	
Vehículo	100 %		0 %		0 %	
PEA 1	85,8 %		14,2 %		0 %	
PEA 10	75 %		12,5 %		12,5 %	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo V:

EFECTO DE LA PALMITOILETANOLAMIDA EN LA LOCOMOCIÓN CONDICIONADA Y LA SENSIBILIZACIÓN CONDUCTUAL INDUCIDA POR COCAÍNA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción.

La locomoción condicionada (LC) y la sensibilización conductual (SC) son procesos fundamentales en la adquisición y el mantenimiento de la conducta adictiva. Por lo tanto, la habilidad de ciertas drogas de abuso, como es el caso de la cocaína, para inducir sensibilización comportamental está estrechamente relacionada con su capacidad para generar dependencia (De Vries et al., 1998). En este estudio hemos evaluado el efecto de la PEA en la adquisición y expresión de la LC y SC inducidas por cocaína, diseñando para ello dos experimentos diferentes.

El primer experimento pretende evaluar la capacidad de la PEA para bloquear o reducir la adquisición de la LC y la SC inducida por cocaína. El diseño experimental, en este caso, consistió en administrar PEA a distintas dosis (1 ó 10 mg/kg) durante la fase de condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) y, a continuación, analizar la LC tras la administración de vehículo y la SC administrando un “*priming*” de cocaína a la mitad de la dosis empleada durante el condicionamiento.

En el segundo experimento llevado a cabo, quisimos comprobar el efecto de la PEA en la expresión de la LC y la SC inducida por cocaína después de que los animales hubiesen sido condicionados con cocaína. Para ello, todos los animales fueron tratados con cocaína durante la fase de condicionamiento, realizando a continuación las pruebas de LC y SC. La PEA (1 ó 10 mg/kg) fue administrada 30 min. antes de cada una de estas dos pruebas para evaluar si producía algún efecto en el grado de expresión de la LC y la SC.

EXPERIMENTO 1: Efecto de la administración repetida de PEA en la adquisición de la LC y SC inducida por cocaína.

1. Material y métodos.

1.1. Protocolo de LC y SC inducida por cocaína con administración repetida de PEA durante el condicionamiento.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron 30 ratones que se dividieron de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: vehículo (n= 8), cocaína (n= 8), cocaína + PEA a dosis de 1 mg/kg (n= 7) y cocaína + PEA a dosis de 10 mg/kg (n= 7). Para la evaluación comportamental se empleó un campo abierto de cuatro arenas (descrito en el apartado 4.4. de *Pruebas de comportamiento*). Los animales fueron sometidos a un procedimiento conductual de un total de 12 días, dividido en cuatro fases (Figura 21). Una primera fase (día 1) consistió en medir los cambios locomotores inducidos por la administración aguda de PEA en un estado libre de droga (sin administración de cocaína). Para ello los animales fueron tratados con vehículo, PEA 1 ó PEA 10 mg/kg y expuestos al campo abierto durante un tiempo total de 30 min.

La segunda fase (día 2 al 6) se realizó durante los siguientes cinco días consecutivos. Durante esta fase de condicionamiento los animales fueron tratados con vehículo, cocaína (20 mg/kg), cocaína + PEA 1 (1 mg/kg) o cocaína + PEA 10 (10 mg/kg) y expuestos al campo abierto durante 30 min. La PEA siempre fue administrada i.p. 30 min. antes de cada ensayo. Después de los cinco días de condicionamiento se dejó descansar a los animales un día (día 7). Al día siguiente (día 8), todos los animales fueron tratados con vehículo y expuestos al campo abierto durante 30 min. para conocer el grado de adquisición de la LC inducida por cocaína.

A continuación, los animales descansaron tres días sin recibir ningún tratamiento ni pasar por el campo abierto (día 9 al 11). Por último, cinco días después de la última administración de cocaína (día 12), los animales fueron tratados con un cebador o “*priming*” de droga a la mitad de la dosis empleada durante el condicionamiento (10 mg/kg) para poder evaluar la respuesta de SC inducida por cocaína. El grupo tratado con vehículo durante el condicionamiento recibió una administración aguda de cocaína con una dosis de 10 mg/kg.

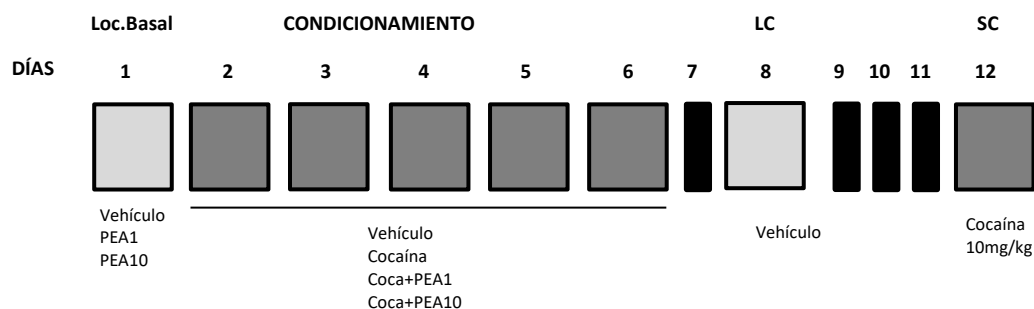


Figura 21. Esquema de las fases en el proceso de sensibilización a cocaína. En una primera fase se registró la locomoción basal tras la administración de los distintos tratamientos. La segunda fase consistió en el condicionamiento con administración de cocaína, vehículo o cocaína y PEA a diferentes dosis (1 ó 10 mg/kg). En la tercera fase se evaluó la respuesta de LC inducida por cocaína tras la administración de vehículo. Por último se evaluó la respuesta de SC inducida por cocaína tras la administración de un “*priming*” de cocaína a 10 mg/kg.

1.2. Análisis estadísticos.

En primer lugar, se estudió el efecto locomotor de la administración aguda de PEA 1 ó 10 mg/kg en relación al grupo tratado con vehículo, mediante un ANOVA de una vía. A continuación, se compararon las medidas de la distancia recorrida en cada ensayo de condicionamiento, empleando un ANOVA de medidas repetidas. Por último, se empleó un ANOVA de una vía para comparar la distancia recorrida durante el ensayo de LC y de SC en función del pre-tratamiento recibido durante el condicionamiento (vehículo, cocaína, cocaína + PEA1 y cocaína + PEA10). Este análisis permitió evaluar el efecto del tratamiento de PEA en la adquisición de las respuestas de LC y SC inducidas por cocaína. Cuando el resultado de los ANOVAs fue estadísticamente significativo se aplicó la prueba de significación a posteriori (post-hoc) de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD).

2. Resultados.

2.1. Locomoción libre de droga en animales tratados con vehículo, PEA 1 mg/kg y PEA 10 mg/kg.

El análisis de los efectos locomotores de la administración aguda de PEA reveló diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento (efecto de “tratamiento”: $F(2, 27)=39,79; p\leq 0,001$). En concreto, el análisis post-hoc reveló que el grupo tratado con PEA a dosis de 10 mg/kg mostró una menor locomoción respecto a los demás grupos experimentales ($p\leq 0,05$) (Figura 22).

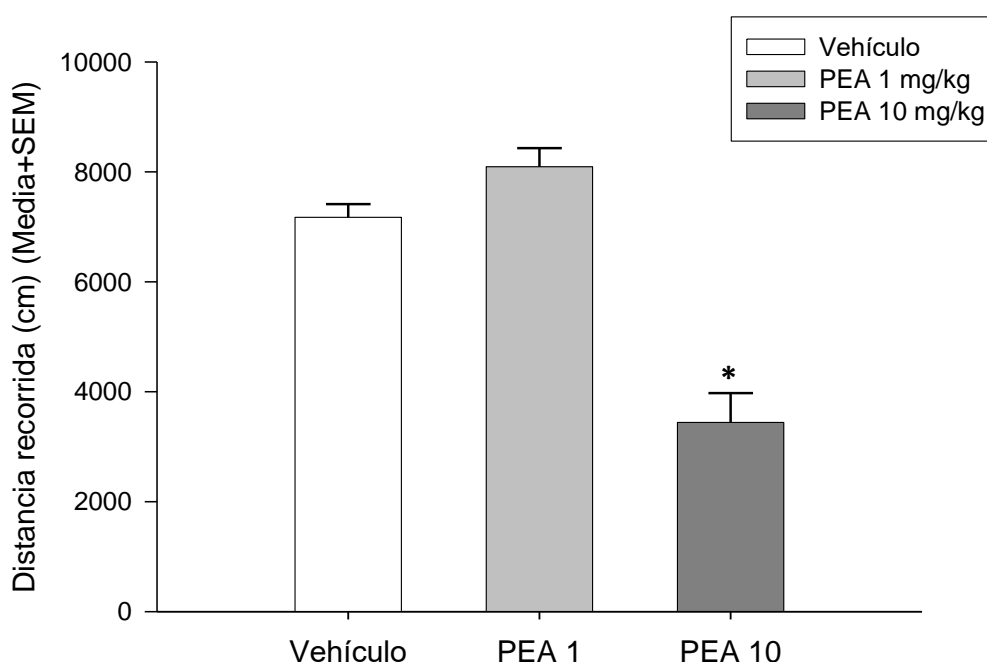


Figura 22. Locomoción basal tras la administración aguda de vehículo, PEA 1 o PEA 10 mg/kg. La gráfica muestra la locomoción basal en el campo abierto para cada tratamiento. Los animales tratados con PEA 10 mg/kg mostraron menor locomoción que el resto de los grupos. *Diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás grupos experimentales ($p\leq 0,05$).

2.2. Efecto del tratamiento repetido de PEA durante el condicionamiento.

El análisis mediante el ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas en función del tratamiento recibido (efecto de “tratamiento”: $F(3, 26)=34,14; p\leq 0,001$) así como en la interacción de las variables día y tratamiento (efecto del “tratamiento x día”: $F(12, 104)=2,10; p\leq 0,05$) (Figura 23). El análisis post-hoc reveló que fue únicamente el grupo tratado con vehículo el que mostró una menor locomoción durante todos los días de tratamiento respecto a los demás grupos

experimentales ($p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas en la locomoción en función del día de condicionamiento (efecto de “día”: $F(4, 104) = 0,54$; $p > 0,05$). Es importante destacar que el tratamiento con PEA no provocó ningún efecto en la locomoción inducida por cocaína durante los distintos días de condicionamiento.

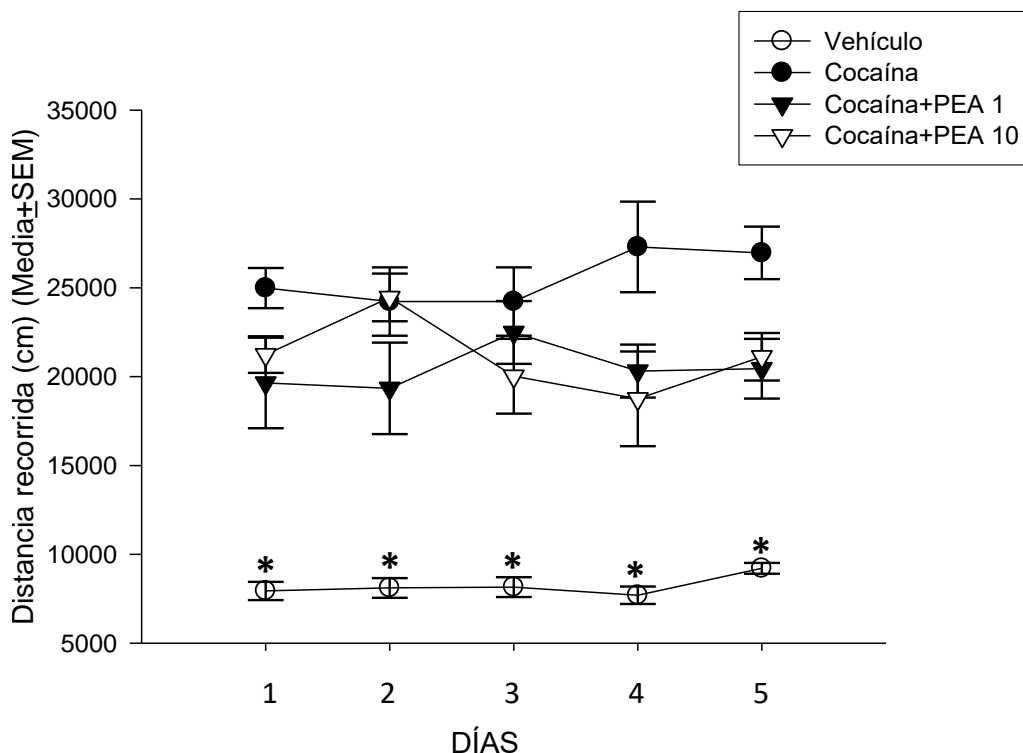


Figura 23. Locomoción durante la fase de condicionamiento a cocaína. La gráfica muestra la locomoción durante los cinco días de condicionamiento para cada tratamiento. Los animales tratados con vehículo mostraron una menor locomoción que el resto de los grupos experimentales en todos los días durante la fase de condicionamiento. No se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con cocaína y los grupos tratados con cocaína y PEA (1 ó 10 mg/kg). *Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales ($p \leq 0,05$).

2.3. Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición de la LC inducida por cocaína.

El análisis estadístico reveló un efecto significativo del tratamiento administrado durante el condicionamiento en la adquisición de la LC inducida por cocaína (efecto de “pre-tratamiento”: $F(3, 26) = 6,38$; $p \leq 0,01$). El análisis post-hoc reveló que el grupo pre-tratado con cocaína mostró una mayor respuesta de LC que el resto de los grupos experimentales ($p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos pre-tratados con cocaína + PEA a dosis de 1 ó 10 mg/kg y el grupo pre-tratado con

vehículo (Figura 24). En conjunto, estos resultados indican que la administración repetida de PEA durante el condicionamiento a ambas dosis, bloquea o interfiere con la adquisición de la LC inducida por cocaína.

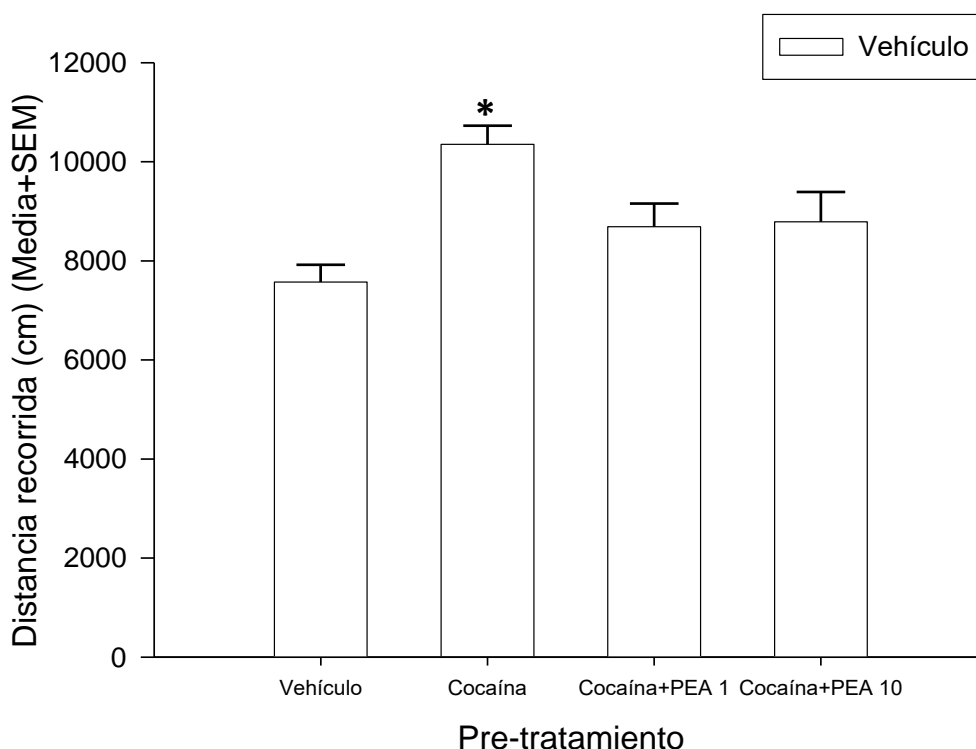


Figura 24. Locomoción condicionada inducida por cocaína. La gráfica muestra la locomoción durante el ensayo de LC, en función del pre-tratamiento recibido durante el condicionamiento. Los animales pre-tratados con cocaína mostraron una mayor LC que el resto de los grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo pre-tratado con vehículo y los grupos pre-tratados con cocaína y PEA (1 ó 10 mg/kg), indicando que el tratamiento con ambas dosis de PEA durante el condicionamiento bloquea la adquisición de la LC inducida por cocaína. *Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales ($p \leq 0,05$).

2.4. Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición de la SC inducida por cocaína.

Los análisis estadísticos mostraron que el pre-tratamiento recibido por los animales afectó a la adquisición de la SC inducida por cocaína (efecto de “pre-tratamiento”: $F(3, 26) = 14,56$; $p \leq 0,001$). En concreto, el análisis post-hoc reveló que el grupo pre-tratado con cocaína tenía una mayor respuesta de SC no sólo respecto al grupo pre-tratado con vehículo, sino también respecto a los grupos pre-tratados con

cocaína + PEA 1 ó 10 mg/kg ($p \leq 0,05$). Además, el grupo pre-tratado con cocaína + PEA 1 mg/kg redujo significativamente la locomoción total respecto al grupo pre-tratado con vehículo ($p \leq 0,05$), pero no respecto al grupo pre-tratado con PEA 10 mg/kg ($p > 0,05$) (Figura 25). En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento repetido de PEA a ambas dosis durante el condicionamiento bloquea la adquisición de la SC inducida por cocaína.

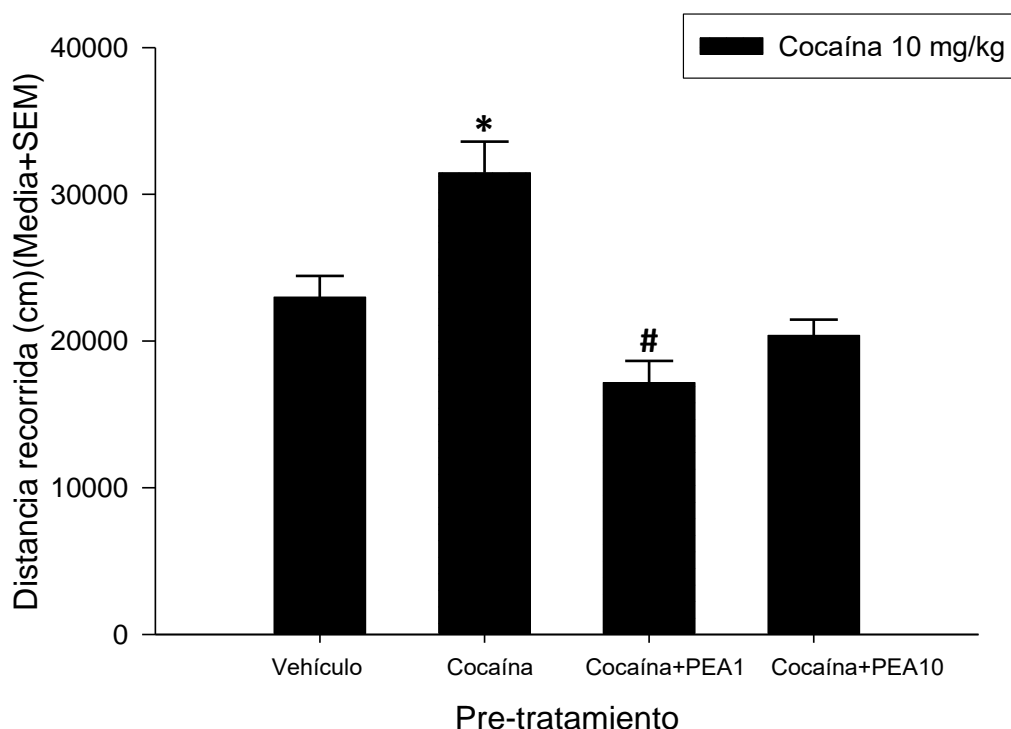


Figura 25. Sensibilización condicionada inducida por cocaína. La gráfica muestra la locomoción durante el ensayo de SC, en función del pre-tratamiento recibido durante el condicionamiento. Los animales pre-tratados con cocaína exhibieron una mayor SC que el resto de los grupos experimentales. Además, el grupo pre-tratado con cocaína+PEA 1 presentó una menor respuesta de SC respecto al grupo pre-tratado con vehículo. Estos resultados indican que el tratamiento repetido de PEA durante el condicionamiento bloquea la adquisición de la SC inducida por cocaína. *Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales ($p \leq 0,05$); #Diferencia significativa respecto al grupo pre-tratado con vehículo ($p \leq 0,05$).

EXPERIMENTO 2: Efecto de la administración aguda de PEA en la expresión de la LC y SC inducida por cocaína.

1. Material y métodos.

1.1. Protocolo de LC y SC inducida por cocaína con administración aguda de PEA.

Para llevar a cabo este experimento se emplearon 41 ratones. Antes de comenzar el estudio comportamental se dividieron a los animales de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: vehículo (n= 8), cocaína (n= 11); cocaína + PEA a dosis de 1mg/kg (n= 11) y cocaína + PEA a dosis de 10mg/kg (n= 11). Para la evaluación conductual se utilizó un campo abierto de cuatro arenas (descrito en el apartado 4.4. de *Pruebas de comportamiento*) y se situó a cada animal en el centro de cada arena tras la administración del tratamiento correspondiente permitiendo que lo explorasen libremente durante 30 min.

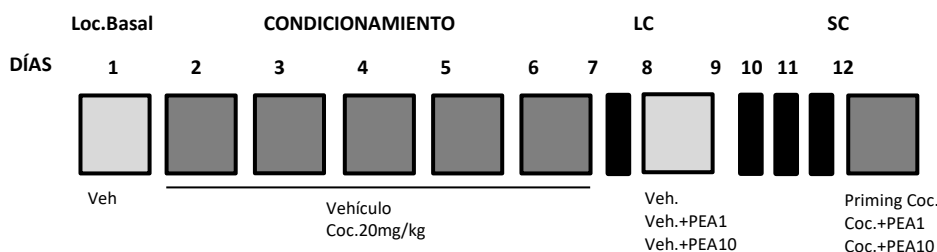


Figura 26. Esquema de las fases en el proceso de sensibilización a cocaína. En una primera fase se midió la locomoción basal de todos los animales. La segunda fase consistió en el condicionamiento con administración de cocaína 20 mg/kg o vehículo. En la tercera fase se evaluó la respuesta de LC inducida por cocaína tras la administración de vehículo con o sin PEA a diferentes dosis (1 ó 10 mg/kg). Por último, se evaluó la respuesta de SC inducida por cocaína tras la administración de un “*priming*” de cocaína a 10 mg/kg con o sin PEA (1 ó 10 mg/kg).

El procedimiento conductual consta de 12 días divididos en cuatro fases (Figura 26). En la primera fase (día 1) se midió la locomoción basal libre de droga (previa administración de vehículo). Durante los siguientes cinco días (día 2 al 6) se llevó a cabo la fase de condicionamiento, en la cual todos los animales fueron tratados con vehículo o con cocaína (20 mg/kg). Se dejó a los animales descansar durante un día (día

7) y al siguiente (día 8) se realizó la prueba de LC para conocer el grado de expresión de la LC inducida por cocaína. Para ello se dividió al grupo tratado con cocaína en 3 grupos experimentales: vehículo (NaCl 0,9%), vehículo + PEA 1 mg/kg y vehículo + PEA 10 mg/kg. El grupo pre-tratado con vehículo recibió una administración de vehículo previa al ensayo de LC.

Los tres días siguientes (día 9 al 11) no se administró ningún tratamiento a los animales ni fueron testados en el campo abierto. Por último, después de cinco días desde la última administración de cocaína (día 12), los animales fueron tratados con un cebador o “*priming*” de droga a la mitad de la dosis empleada durante el condicionamiento (10 mg/kg) para poder evaluar la expresión de la SC inducida por cocaína. En este caso se mantuvo la división realizada para la prueba anterior de los 3 grupos experimentales, siendo tratados de la siguiente manera: cocaína, cocaína + PEA 1 (1 mg/kg) ó cocaína + PEA 10 (10 mg/kg). En cambio, el grupo pre-tratado con vehículo recibió una administración aguda de cocaína a dosis de 10 mg/ kg.

1.2. Análisis estadísticos.

Durante la fase de condicionamiento se analizó el efecto de la administración diaria de cocaína sobre la actividad locomotora (distancia total recorrida (cm.)) en relación al grupo tratado con vehículo, empleando para ello un ANOVA de medidas repetidas. A continuación se estudió el grado de expresión de la LC en función del tratamiento administrado (vehículo, PEA 1 mg/kg o PEA 10 mg/kg) mediante un ANOVA de una vía. Por último, se compararon las medidas de la distancia recorrida durante el ensayo de SC en función del tratamiento recibido (cocaína 10 mg/kg, cocaína 10 mg/kg + PEA1 y cocaína 10 mg/kg + PEA10) empleando el mismo análisis estadístico, para comprobar el efecto de PEA en la expresión de la SC. Se aplicó la prueba de significación a posteriori (post-hoc) de la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD) cuando el resultado del ANOVA fue estadísticamente significativo.

2. Resultados.

2.1. Efecto del tratamiento con cocaína durante las sesiones de condicionamiento.

Todos los animales partieron de unos niveles de locomoción homogénea. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre los animales condicionados con cocaína y el grupo tratado con vehículo (efecto de “tratamiento”: $F(1, 39)=134,05$; $p \leq 0,001$) (Figura 27). En concreto, el análisis post-hoc reveló que el grupo tratado con cocaína exhibió mayor locomoción que el grupo tratado con vehículo durante los cinco días de condicionamiento ($p \leq 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la locomoción en función del día de condicionamiento (efecto de “día”: $F(4, 156)=0,38$; $p > 0,05$), ni en la interacción del día y el tratamiento (efecto de “día x tratamiento”: $F(4, 156)=0,14$; $p > 0,05$).

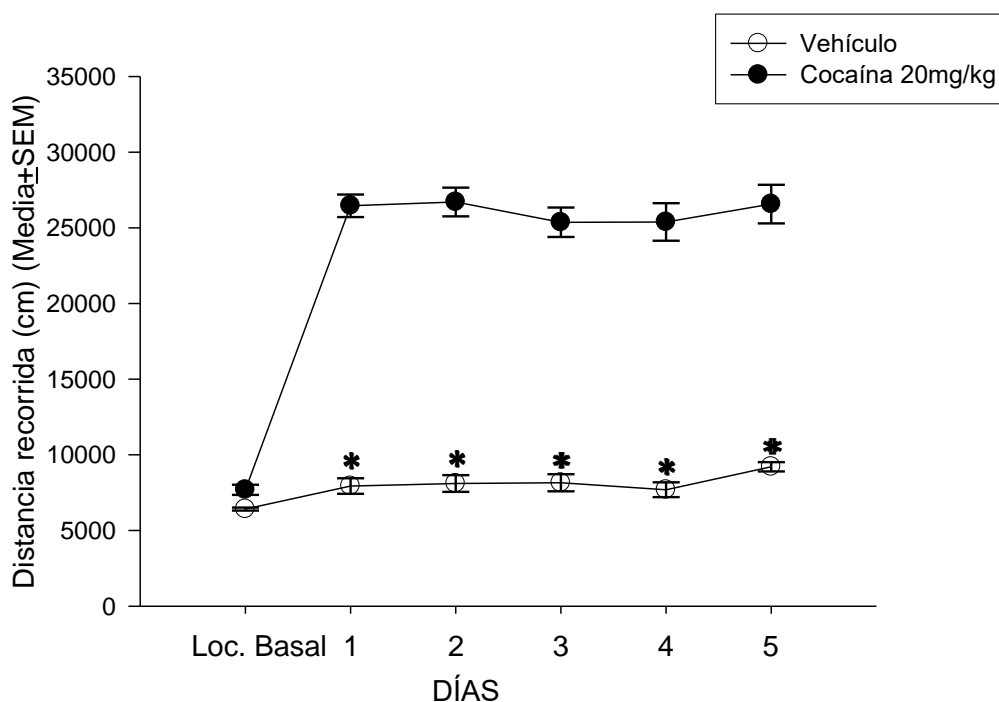


Figura 27. Locomoción durante la fase de condicionamiento. La gráfica muestra la locomoción durante los cinco días de condicionamiento en el grupo de animales tratados con cocaína y vehículo. Los animales tratados con cocaína durante la fase de condicionamiento, mostraron una mayor locomoción que el grupo tratado con vehículo. *Diferencia significativa respecto al grupo tratado con cocaína ($p \leq 0,05$).

2.2. Efecto del tratamiento agudo de PEA en la expresión de la LC inducida por cocaína.

El análisis mediante el ANOVA de una vía reveló diferencias significativas en la expresión de la LC en función del tratamiento recibido (efecto de “tratamiento”: $F(3, 37)=11,16$; $p\leq 0,001$). El análisis post-hoc mostró que el grupo tratado 30 min. antes del ensayo de LC con PEA a dosis de 10 mg/kg, presentó una reducción en la locomoción total con respecto a los animales que habían condicionado con cocaína y que recibieron una administración de vehículo o PEA a dosis de 1 mg/kg previo al ensayo de LC ($p\leq 0,05$). Además, el grupo pre-tratado con vehículo mostró una reducción significativa de la locomoción total con respecto a los demás grupos experimentales ($p\leq 0,05$) (Figura 28). Estos datos indican que la administración aguda de PEA 10 mg/kg es capaz de reducir la expresión de la LC inducida por cocaína.

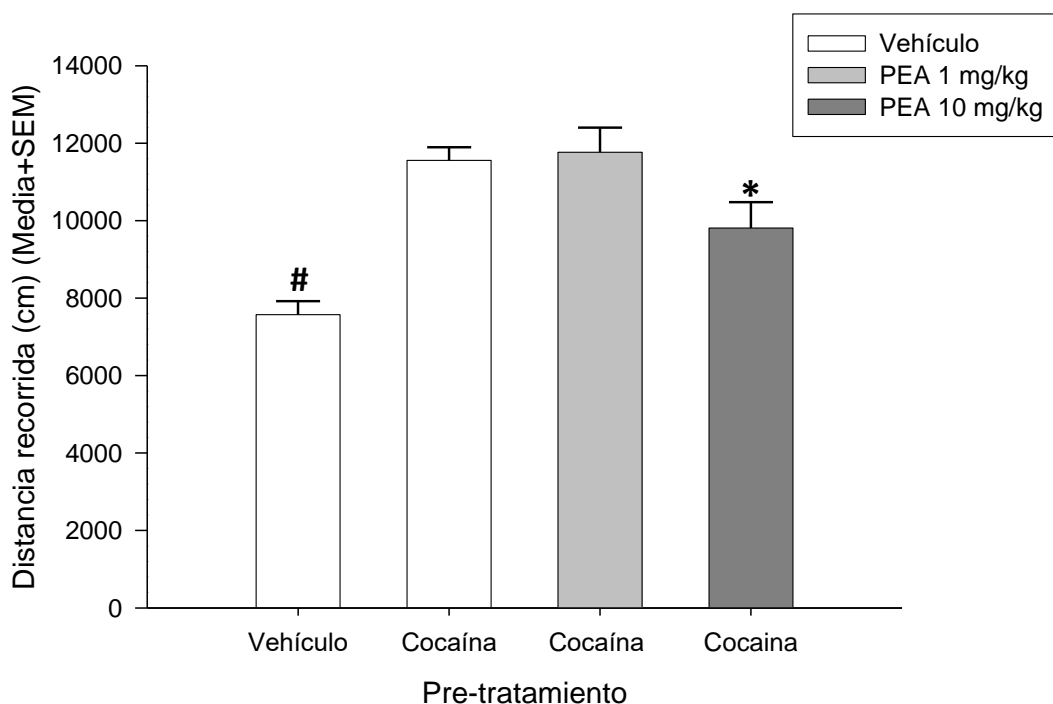


Figura 28. Locomoción condicionada inducida por cocaína. La gráfica muestra la locomoción mostrada por los cuatro grupos experimentales durante el ensayo de LC. El grupo pre-tratado con vehículo exhibió una menor locomoción que el resto de los grupos. Además, los animales tratados con PEA 10 mg/kg tuvieron menor locomoción que los grupos pre-tratados con cocaína y que recibieron una administración de vehículo o de PEA 1 mg/kg, indicando que el tratamiento con PEA 10 mg/kg reduce la expresión de la LC inducida por cocaína. *Diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos pre-tratados con cocaína que recibieron una administración de vehículo o de PEA 1 mg/kg previa

a la sesión de LC ($p \leq 0,05$); #Diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de los grupos experimentales ($p \leq 0,05$).

2.3. Efecto del tratamiento agudo de PEA en la SC inducida por cocaína.

Los análisis estadísticos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la SC inducida por un “*priming*” de cocaína en función del tratamiento administrado (efecto de “tratamiento”: $F(3, 37) = 4,28$; $p \leq 0,01$). El análisis post-hoc reveló que el grupo pre-tratado con cocaína y que además recibió el “*priming*” con la droga a la mitad de la dosis, presentó un aumento significativo de la locomoción con respecto al resto de los grupos experimentales ($p \leq 0,05$) (Figura 29). Además, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la SC entre el grupo pre-tratado con vehículo y los grupos pre-tratados con cocaína que recibieron una administración de PEA 1 ó 10 previa al ensayo. Estos resultados indican que el tratamiento agudo con ambas dosis de PEA redujo significativamente la actividad locomotora, indicando que la PEA es capaz de bloquear o interferir con la expresión de la SC inducida por cocaína.

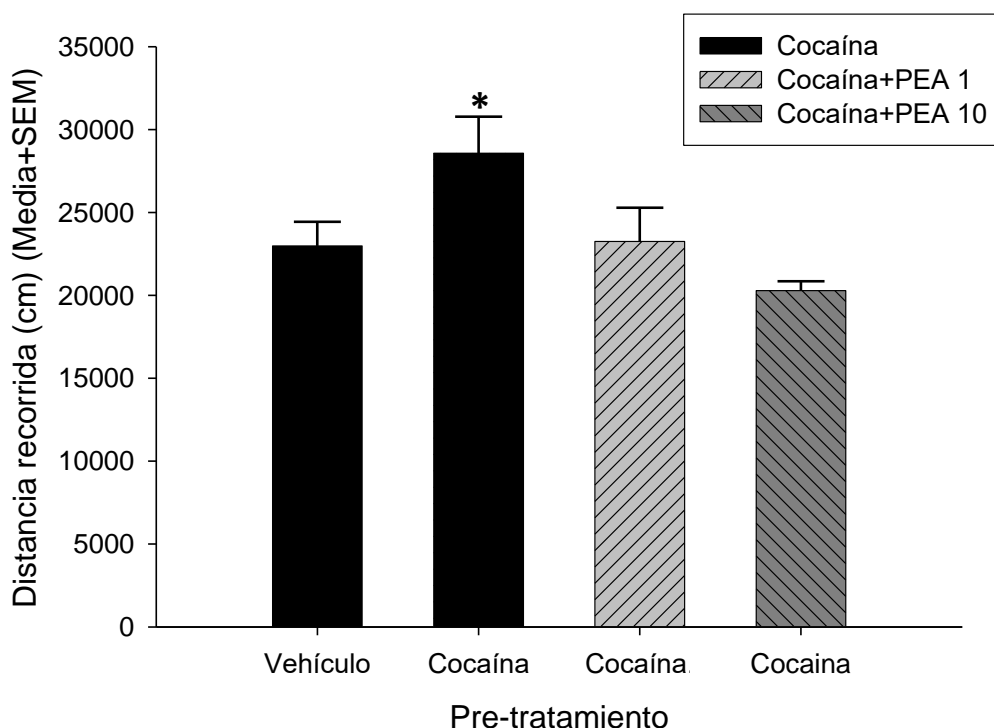


Figura 29. Sensibilización condicionada inducida por cocaína. La gráfica representa la locomoción durante el ensayo de SC, mostrada por cada uno de los grupos experimentales. Los animales pre-tratados con cocaína que recibieron un “*priming*” de cocaína, mostraron mayor locomoción que el resto de los grupos experimentales. Estos resultados indican que el tratamiento agudo de PEA a ambas dosis (1 ó 10 mg/kg) bloquea la expresión de la SC inducida por cocaína. *Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo VI:

EFECTO DE LA PALMITOILETANOLAMIDA EN EL CONDICIONAMIENTO DE LUGAR PREFERENCIAL INDUCIDO POR COCAÍNA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción.

El condicionamiento de lugar preferencial (CLP) es un modelo ampliamente utilizado en la investigación sobre adicción a diferentes drogas de abuso, entre ellas la cocaína (para una descripción detallada véase 4.2.de *Modelos animales empleados en el estudio de la adicción a drogas de abuso*). En nuestro estudio, hemos empleado este modelo para poder evaluar el efecto de la PEA en el proceso de adquisición y expresión del CLP. En un primer experimento, se pretendió analizar la posible implicación de la PEA durante el desarrollo de la adquisición del condicionamiento contextual inducido por cocaína. Para ello se administró PEA a distintas dosis (1 ó 10 mg/kg) 30 min. previos a la inyección de cocaína (20 mg/kg) durante la fase de condicionamiento y se llevó a cabo una prueba de preferencia de lugar para poder comparar el grado de adquisición del CLP con aquellos animales que habían sido tratados únicamente con cocaína.

En un segundo experimento, evaluamos el efecto agudo de la PEA en la expresión del CLP ya adquirido previamente. Por lo tanto, todos los animales fueron sometidos a una fase de condicionamiento con cocaína seguida de un test de preferencia para asegurarnos de que habían adquirido correctamente el CLP. A continuación, se realizó otro test de preferencia, pero esta vez previa administración de PEA (1 ó 10 mg/kg) o de vehículo, permitiendo así comprobar la capacidad de PEA para bloquear o no la expresión del CLP inducido por cocaína.

EXPERIMENTO 1: Efecto de la PEA sobre la adquisición del Condicionamiento de Lugar Preferencial.

1. Material y métodos.

1.1. Protocolo de CLP con administración repetida de PEA durante el condicionamiento.

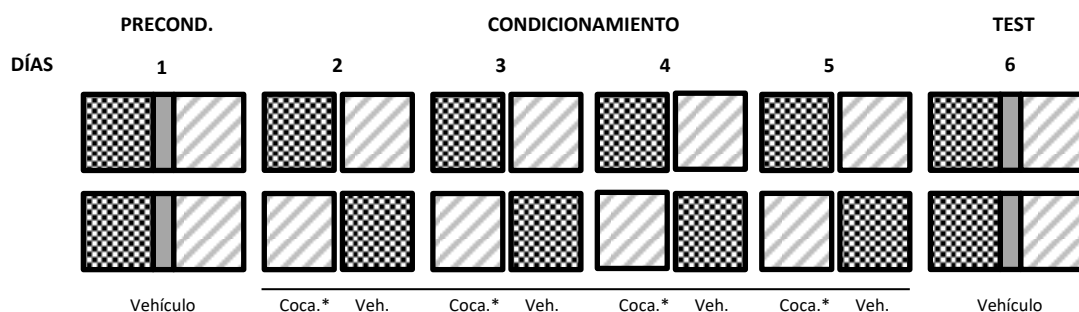
Para llevar a cabo este experimento se han utilizado 36 ratones que se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos experimentales: cocaína (n= 10), cocaína + PEA a dosis de 1 mg/kg (n= 9) y cocaína + PEA a dosis de 10 mg/kg (n= 9). Para la evaluación comportamental se emplearon tres cajas de CLP (descritas en el apartado 4.5. de *Pruebas de comportamiento*). El procedimiento conductual consistió en tres fases diferentes: fase de pre-condicionamiento (una sesión en la que se permite al animal explorar libremente ambos compartimentos durante 20 min.), fase de condicionamiento (cuatro sesiones con dos ensayos de 30 min. por día) y Test de preferencia libre de droga (una última sesión, tratados con vehículo, en la que se permitió al animal explorar ambos compartimentos durante 20 min.) (Figura 30).

En primer lugar, los animales fueron expuestos a las cajas de CLP en ausencia de droga y se les permitió que la explorasen libremente durante 20 min. (fase de pre-condicionamiento). A continuación, la fase de condicionamiento a cocaína (día 2 al 5) se realizó mediante un procedimiento sesgado, por el cual los animales fueron administrados con cocaína en el compartimento por el cual no mostraron preferencia durante el pre-condicionamiento, e inyectados con vehículo en el compartimento preferido durante el pre-condicionamiento (Aguilar et al., 2009). Los animales se dividieron al azar en 3 grupos experimentales: un grupo control al que sólo se le administró cocaína durante el condicionamiento, un grupo al que se le administró cocaína junto con PEA a dosis de 1 mg/kg y un grupo que condicionó con cocaína junto con PEA a dosis de 10 mg/kg. Durante esta fase de condicionamiento, cada día se realizó un ensayo en el que se emparejó la administración i.p. de cocaína (20 mg/kg) en uno de los dos compartimentos (CS+, del inglés *Positive Conditioned Stimulus*) y un ensayo en el cual se administró vehículo en el compartimento contrario al que recibió cocaína (CS-, del inglés *Neutral Conditioned Stimulus*). Los ensayos, de 30 min. cada

uno, se realizaron con al menos 210 min. de separación entre ellos y se registró la locomoción total en cada uno de ellos.

Por último, los animales fueron sometidos a la prueba de preferencia de lugar, en la cual, tras la administración de vehículo, se permitió la exploración libre de ambos compartimentos durante un tiempo total de 20 min. Tanto en el ensayo de pre-condicionamiento (día 1) y la prueba de preferencia (día 6) se administró vehículo i.p. y se colocó a cada animal en el pasillo central para poder medir la cantidad de tiempo que pasaban en cada compartimento. Además, se registró la distancia recorrida total y la de cada uno de los dos compartimentos por separado.

Durante la fase de pre-condicionamiento, se calculó para cada animal el grado de preferencia mostrado por los compartimentos (puntuación CLP) restando el tiempo (seg.) de permanencia en el compartimento que va a ser asociado a la droga (CS+) del tiempo de permanencia en el compartimento que va a ser asociado al vehículo (CS-). De forma similar, también se calculó la puntuación de CLP obtenida durante el test de preferencia: (tiempo de permanencia en CS+) - (tiempo de permanencia en CS-).



*Coca./ Coca+PEA1/ Coca+PEA10

Figura 30. Esquema que representa las tres fases del proceso de condicionamiento de lugar preferente. La primera fase consistió en la prueba de pre-condicionamiento en un estado libre de droga. La segunda fase consta de 4 días de condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) administrada de forma aislada o con PEA a diferentes dosis (1 ó 10 mg/kg). Por último, se llevó a cabo la prueba de CLP para comprobar el efecto de la administración repetida de PEA en la adquisición del condicionamiento de lugar preferente inducido por cocaína.

1.2. Análisis estadísticos.

En primer lugar, se comprobó el efecto de la administración de PEA en el incremento de la actividad locomotora inducido por cocaína durante la fase de

condicionamiento, empleando para ello un ANOVA de medidas repetidas. A continuación, para conocer el efecto de la administración repetida de la PEA durante el condicionamiento sobre la adquisición del CLP, se compararon las puntuaciones obtenidas en la sesión del test de preferencia con la sesión de pre-condicionamiento empleando un ANOVA de medidas repetidas.

También se compararon las medidas de distancia recorrida en cada compartimento (CS+ ó CS-) durante la prueba de preferencia con respecto al pre-condicionamiento para poder comprobar si existían diferencias en la adquisición de la LC en función del tratamiento recibido durante el condicionamiento. En este caso, el análisis estadístico empleado fue un ANOVA con dos medidas repetidas (día (pre-condicionamiento/test) y compartimento (CS+/CS-)). Por último, se calculó la tasa de cambio de la distancia recorrida en el compartimento CS+ en la prueba de preferencia con respecto al pre-condicionamiento mediante la siguiente fórmula: [(Locomoción CS+ en Test – Locomoción CS+ en pre-condicionamiento) / Locomoción CS+ en pre-condicionamiento] x 100. Para comprobar si existía diferencia en la tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ en función del tratamiento recibido durante el condicionamiento, se empleó un ANOVA de una vía. Cuando el resultado de los ANOVAs fue estadísticamente significativo se aplicó la prueba de significación a posteriori de Fisher (LSD).

2. Resultados.

2.1. Efecto del tratamiento repetido de PEA en la locomoción inducida por cocaína durante la fase de condicionamiento.

El ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias significativas entre los ensayos en los que los animales fueron tratados con cocaína y en los que fueron tratados con vehículo (efecto de ‘ensayo’: $F(7, 175) = 80,81; p \leq 0,001$). Según indica el análisis post-hoc, los tres grupos experimentales presentaron una menor locomoción en cada ensayo en el que fueron tratados con vehículo respecto a cada ensayo en el que fueron tratados con cocaína con o sin PEA ($p \leq 0,05$) (Figura 31). Los resultados estadísticos no revelaron una diferencia significativa de la locomoción en función del tratamiento recibido (efecto de “tratamiento”: $F(2, 25) = 3,45; p > 0,05$; efecto de “tratamiento x ensayo”: $F(14, 175) = 3,62; p > 0,05$). Estos resultados indican que el tratamiento con

PEA a ambas dosis no afecta al aumento de la locomoción inducido por cocaína durante los distintos días de condicionamiento.

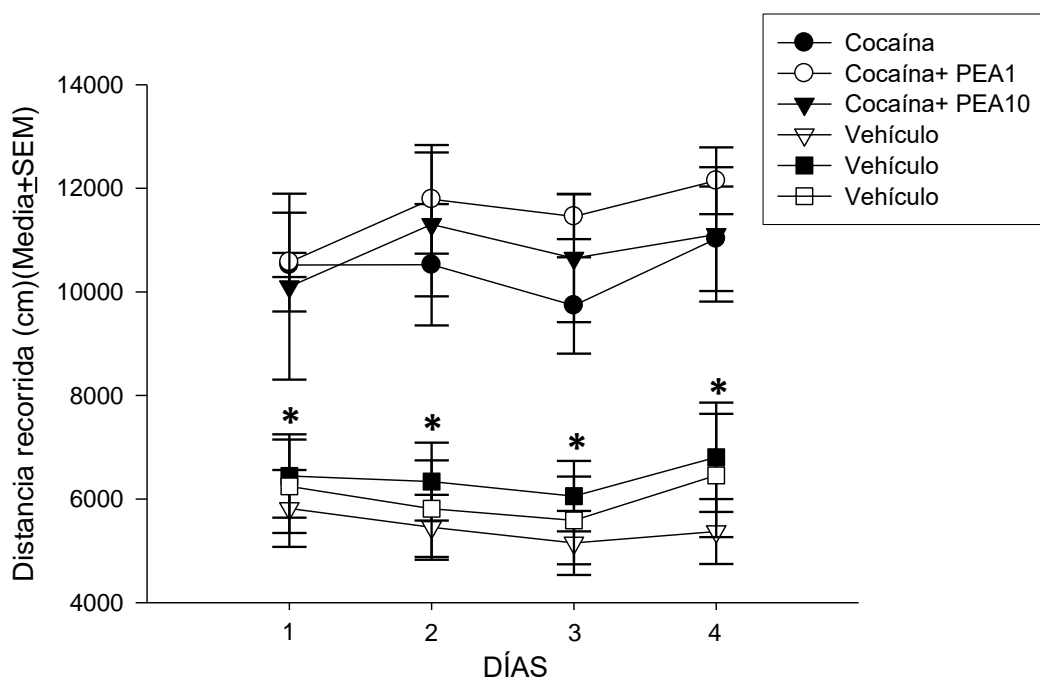


Figura 31. Distancia recorrida durante la fase de Condicionamiento. La gráfica representa la locomoción durante los días de condicionamiento, en función del tratamiento recibido para cada ensayo. Todos los grupos experimentales mostraron menor locomoción en el ensayo en el que fueron tratados con vehículo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la locomoción en los ensayos en los que se administró cocaína con o sin PEA a ambas dosis, indicando que la PEA no afecta al efecto asociativo locomotor inducido por cocaína. *Diferencia significativa respecto al ensayo con cocaína para todos los grupos experimentales en los cuatro días de condicionamiento ($p \leq 0,05$).

2.2. Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición del CLP.

Los análisis estadísticos mostraron la presencia de diferencias significativas en la puntuación obtenida de CLP en función del día de la prueba (efecto de “día”: $F(1, 25)=125,75$; $p \leq 0,001$). Los resultados del post-hoc indican que todos los grupos mostraron una preferencia significativa por el compartimento asociado a droga durante el día del Test ($p \leq 0,05$) (Figura 32). En cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento recibido durante el condicionamiento (efecto de “tratamiento”: $F(2, 25)=0,55$; $p > 0,05$; efecto de “día x tratamiento”: $F(2, 25)=2,72$; $p > 0,05$). Por tanto, todos los animales adquirieron el condicionamiento de lugar preferencial, sin verse afectado por el tratamiento con PEA durante el condicionamiento.

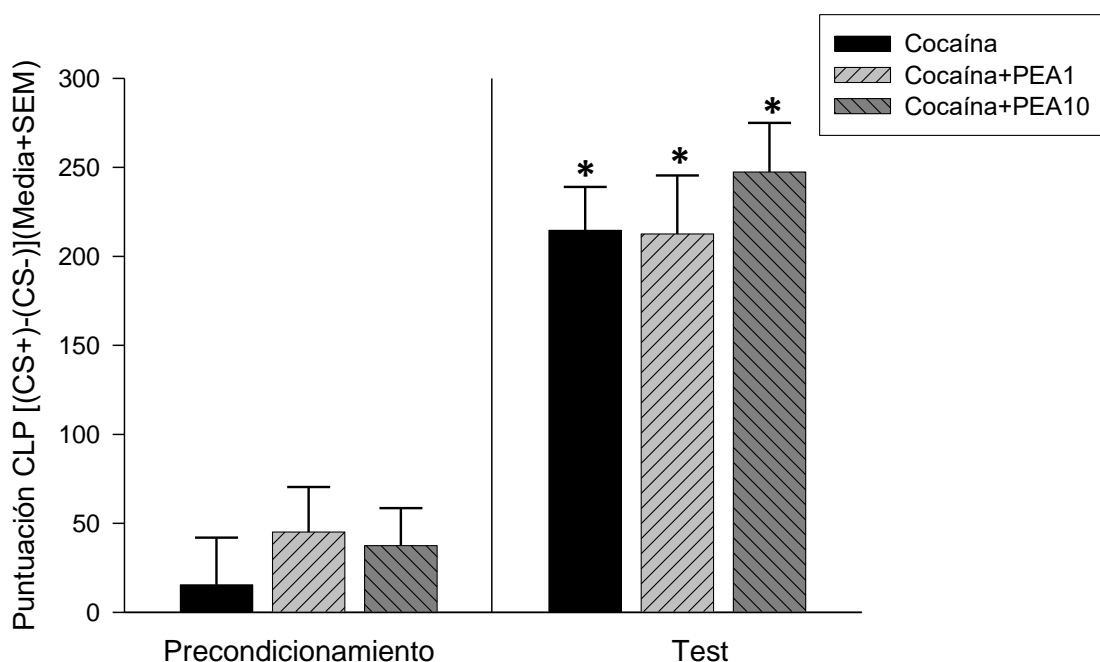


Figura 32. Puntuación de CLP inducido por cocaína. La gráfica representa la puntuación de CLP obtenida en el Pre-condicionamiento y en el Test, en función del tratamiento recibido durante el condicionamiento. Todos los grupos experimentales adquirieron el condicionamiento preferencial de lugar, independientemente del tratamiento recibido en el condicionamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al pre-condicionamiento en los tres grupos experimentales ($p \leq 0,05$).

2.3. Efecto del tratamiento repetido de PEA en la adquisición de la LC inducida por cocaína.

Los resultados del ANOVA de medidas repetidas aplicado para comparar la distancia recorrida en el compartimento que asociado a la droga en la sesión de pre-condicionamiento y en la sesión Test, no reveló ningún efecto en función del tratamiento administrado durante el condicionamiento (efecto de "tratamiento": $F(2, 25)=0,77$; $p > 0,05$), observándose diferencias estadísticamente significativas en función del día (efecto de "día": $F(1, 25)=47,66$; $p \leq 0,001$) y del compartimento (efecto de "compartimento": $F(1, 25)=115,32$; $p \leq 0,001$). Además, también se observaron diferencias estadísticamente significativas en las interacciones de primer orden ("tratamiento x día" ($F(2, 25)=5,81$; $p \leq 0,01$); "día x compartimento" ($F(1, 25)=129,58$; $p \leq 0,001$) y de segundo orden ("tratamiento x día x compartimento" ($F(2, 25)=4,54$; $p \leq 0,05$). El análisis de la interacción "tratamiento x día x compartimento" reveló que todos los grupos experimentales presentaron una mayor locomoción en el

compartimento CS+ durante la prueba de preferencia ($p \leq 0,05$), observándose además que el grupo pre-tratado con cocaína + PEA 10 mostraba significativamente mayor locomoción en dicho compartimento que el grupo pre-tratado con cocaína ($p \leq 0,05$) y cercana a la significatividad con respecto al grupo pre-tratado con PEA1 ($p = 0,076$) (Figura 33). Por último, los resultados no mostraron diferencias significativas en la distancia recorrida en el compartimento CS- entre los tratamientos, ni durante el pre-condicionamiento, ni durante el test ($p > 0,05$).

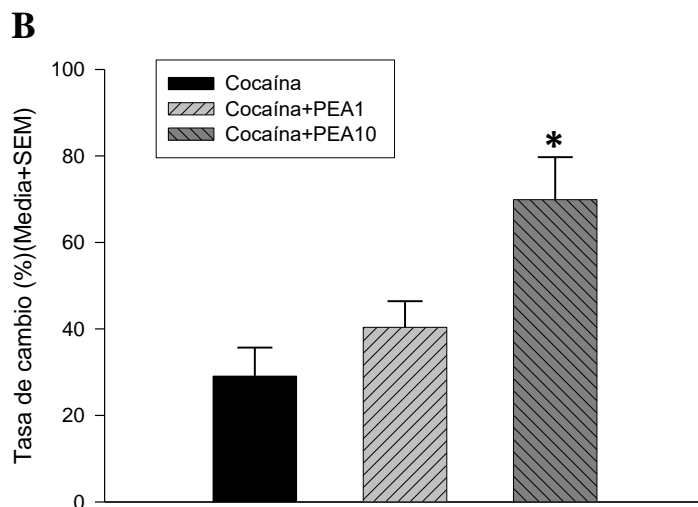
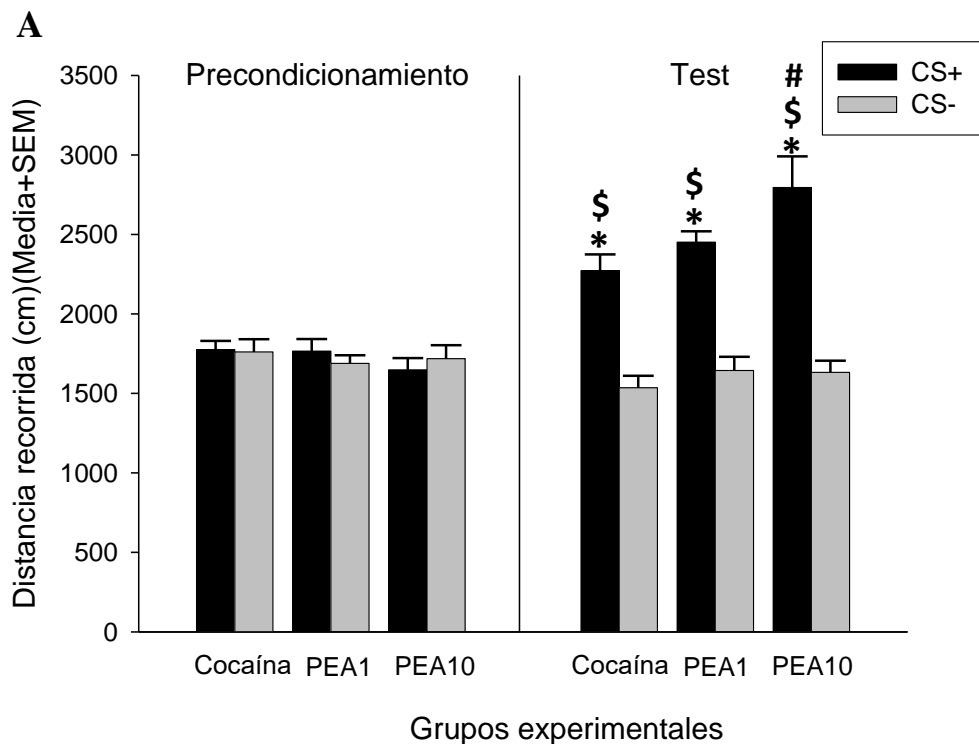


Figura 33. Distancia recorrida en el compartimento CS+ y CS- y tasa de cambio de la distancia recorrida en el compartimento CS+. **A:** La gráfica muestra la distancia recorrida en cada uno de los compartimentos durante el pre-condicionamiento y el Test de preferencia para cada grupo experimental. Todos los grupos experimentales presentaron mayor locomoción en el compartimento CS+ el día del Test. Además, el grupo pre-tratado con cocaína + PEA 10 mg/kg tuvo mayor locomoción en dicho compartimento el día del Test que el grupo pre-tratado con cocaína. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al pre-condicionamiento en la distancia recorrida en CS+ ($p \leq 0,05$); #Diferencia significativa en la distancia recorrida en CS+ el día del Test respecto al grupo pre-tratado con cocaína ($p \leq 0,05$) y cercana a la significatividad respecto al grupo pre-tratado con PEA 1mg/kg ($p = 0,076$); §Diferencia significativa respecto a la distancia recorrida en CS- en el Test ($p \leq 0,05$). **B:** La gráfica muestra la Tasa de cambio de la distancia recorrida en el compartimento CS+ en el Test respecto al pre-condicionamiento para cada grupo experimental. Los animales pre-tratados con cocaína + PEA 10 mg/kg presentaron una tasa de cambio mayor que el resto de los grupos experimentales. *Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales ($p \leq 0,05$).

Por último, el análisis estadístico realizado con la tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ el día del Test con respecto al pre-condicionamiento, reveló un efecto significativo en función del tratamiento (efecto del “tratamiento”: $F(2, 25) = 7,65$; $p \leq 0,01$). El análisis post hoc mostró que los animales pre-tratados con cocaína + PEA 10 presentaron una mayor tasa de cambio que el resto de los grupos experimentales ($p \leq 0,05$) (Figura 33).

Estos datos, en su conjunto, indican que los animales pre-tratados con cocaína + PEA 10 mostraron una LC condicionada mayor, por lo que el tratamiento repetido de PEA a esta dosis podría estar facilitando la asociación contextual de la cocaína con los efectos locomotores inducidos por la misma.

EXPERIMENTO 2: Efecto de la PEA sobre el recuerdo del Condicionamiento de Lugar Preferencial.

1. Material y métodos.

1.1. Protocolo de CLP con administración aguda de PEA.

En este experimento se emplearon 30 ratones divididos aleatoriamente en 3 grupos experimentales: vehículo (n= 10), vehículo + PEA a dosis de 1 mg/kg (n= 12) y vehículo + PEA a dosis de 10 mg/kg (n= 13). Para llevar a cabo la evaluación comportamental se emplearon tres cajas de CLP (descritas en el apartado 4.5. de *Pruebas de comportamiento*). En este experimento, el procedimiento conductual consistió en cuatro fases distintas: fase de pre-condicionamiento (una sesión de 20 min. con administración i.p. de vehículo), fase de condicionamiento (cuatro sesiones con dos ensayos de 30 min. por día), Test de preferencia libre de droga (Test 1, sesión de 20 min. con administración i.p. de vehículo) y un Test de preferencia con PEA y vehículo (Test 2) (Figura 34). La fase de condicionamiento (día 2 al 5) se realizó mediante un procedimiento sesgado, y a todos los animales se les administró cocaína i.p. (20 mg/kg) en uno de los compartimentos (CS+) y solución salina en el compartimento contrario (CS-), invirtiendo su preferencia natural. Ambos ensayos se realizaron con, al menos, 210 min. de separación entre ellos. Tanto en el pre-condicionamiento (día 1) como en la prueba de preferencia (día 6) se administró vehículo i.p. y se dispuso a cada animal en el pasillo central, permitiéndoles que explorasen libremente durante un tiempo total de 20 min. para medir la cantidad de tiempo de permanencia en cada uno de los compartimentos.

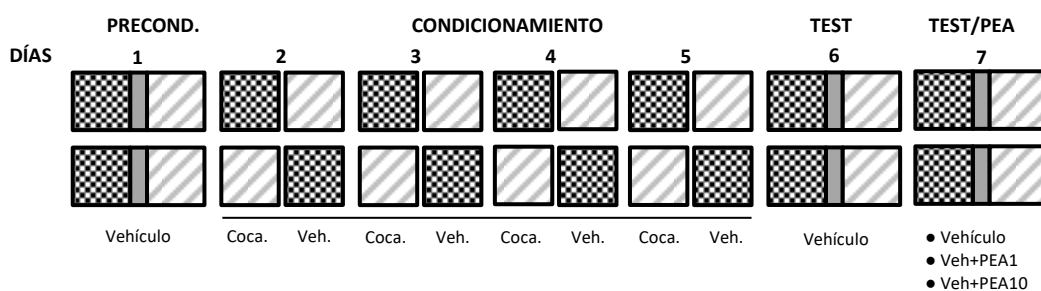


Figura 34. Esquema de las fases en el proceso de condicionamiento de lugar preferente con administración aguda de PEA a distintas dosis (1 ó 10 mg/kg) en el Test 2 de preferencia de lugar inducida por cocaína. La primera fase consistió en la prueba de pre-condicionamiento en un estado libre de droga. La segunda fase consta de 4 días de condicionamiento con

cocaína (20 mg/kg). Durante la tercera fase se llevó a cabo la prueba de CLP para comprobar si los animales muestran preferencia por el compartimento asociado a droga. Por último, al día siguiente se realizó otra prueba de CLP en la cual los animales recibieron previamente una administración de vehículo o de PEA a dosis de 1 ó 10 mg/kg para comprobar el efecto de la administración aguda de PEA sobre la expresión del condicionamiento de lugar preferente inducido por cocaína.

Para la sesión del Test 2 (día 7) se dividieron aleatoriamente a los animales en 3 grupos experimentales: un grupo que recibió una administración de vehículo, un grupo al que se le administró vehículo y PEA 1 mg/kg, y un grupo que fue tratado con vehículo y PEA 10 mg/kg. Se situó a cada animal en el pasillo central y se le permitió que explorase libremente la caja de CLP durante 20 min.

Durante la fase de condicionamiento se registró la locomoción total en cada ensayo, mientras que en las sesiones de pre-condicionamiento, Test 1 y Test 2 se registró la cantidad de tiempo que pasaban en cada compartimento así como la distancia recorrida total y en cada uno de los dos compartimentos.

Además, se restó el tiempo (seg.) de permanencia en el compartimento asociado a la droga (CS+) menos el tiempo de permanencia en el compartimento asociado al vehículo (CS-) durante la sesión de pre-condicionamiento. Por último, las puntuaciones de CLP obtenidas en las sesiones de Test 1 y Test 2 se calcularon de la siguiente manera: (tiempo de permanencia en CS+) - (tiempo de permanencia en CS-). Además, se restó el tiempo (seg.) de permanencia en el compartimento que va a ser asociado a la droga (CS+) menos el tiempo de permanencia en el compartimento que va a ser asociado al vehículo (CS-) durante la sesión de pre-condicionamiento.

1.2. Análisis estadísticos.

En primer lugar, se analizó la fase de condicionamiento para comprobar que se había producido un incremento de la actividad locomotora inducido por cocaína en los ensayos donde fue administrada la droga, empleando para ello un ANOVA de medidas repetidas. Dado que todos los animales pasaron por las mismas condiciones experimentales durante las fases de pre-condicionamiento, condicionamiento y Test 1, se representaron como un único grupo experimental y, exclusivamente, en el Test 2 se realizó la división en 3 grupos experimentales distintos. Para comprobar si los animales habían adquirido una preferencia por el compartimento asociado a la droga durante el condicionamiento, se realizó una T-Student para muestras dependientes comparando la puntuación de CLP en el pre-condicionamiento y en el Test 1. A continuación, se

empleó un ANOVA de medidas repetidas con el objetivo de analizar si existían diferencias estadísticamente significativas en la distancia recorrida por compartimentos entre el pre-condicionamiento y el Test 1, y de esta forma comprobar si los animales mostraban LC inducida por cocaína.

Después de comprobar que los animales habían adquirido una preferencia por el compartimento asociado a droga durante el condicionamiento, se analizó el efecto de la administración de PEA en el recuerdo de CLP en el Test 2 mediante un ANOVA de medidas repetidas, mediante el cual se compararon las puntuaciones de CLP obtenidas en el Test 1 y el Test 2. Además, se comparó la distancia recorrida por compartimentos en el Test 2 en función del tratamiento recibido mediante un ANOVA con dos medidas repetidas (día (test 1/test 2) y compartimento (CS+/CS-)). Por último, se calculó la tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ durante la sesión Test 2 con respecto al Test 1 y se aplicó después un ANOVA de una vía. Cuando el resultado de los ANOVAs fue estadísticamente significativo se aplicó la prueba de significación a posteriori (post hoc) de Fisher (LSD).

2. Resultados.

2.1. *Efecto del tratamiento con cocaína durante la fase de Condicionamiento, en la adquisición del Condicionamiento de Lugar Preferencial y en la LC en el Test 1.*

El análisis estadístico durante la fase de condicionamiento, mostró diferencias significativas de locomoción en función del tratamiento administrado (efecto de “tratamiento”: $F(1, 68)=83,57; p \leq 0,001$) y del día de condicionamiento (efecto de “día”: $F(3, 204)=3,61; p \leq 0,01$), pero no de la interacción de ambas variables (efecto de “día x tratamiento”: $F(3, 204)=1,50; p > 0,05$) (Figura 35 A). El análisis post-hoc mostró una mayor actividad locomotora durante el día 1 de condicionamiento respecto a los días 2 y 3 ($p \leq 0,05$), lo cual puede deberse a un estado inicial de activación por la novedad de la tarea. En todos los días de condicionamiento se observó una disminución significativa de la locomoción durante el ensayo en el que los animales fueron tratados con vehículo respecto al ensayo en el cual recibieron la administración de cocaína ($p \leq 0,05$). Con respecto a la adquisición de la CLP, el análisis estadístico realizado indicó que todos los grupos experimentales mostraron una preferencia significativa el

día del Test 1 por el compartimento asociado a la droga ($t_{34}=-9,48$; $p\leq 0,001$) (Figura 35 B).

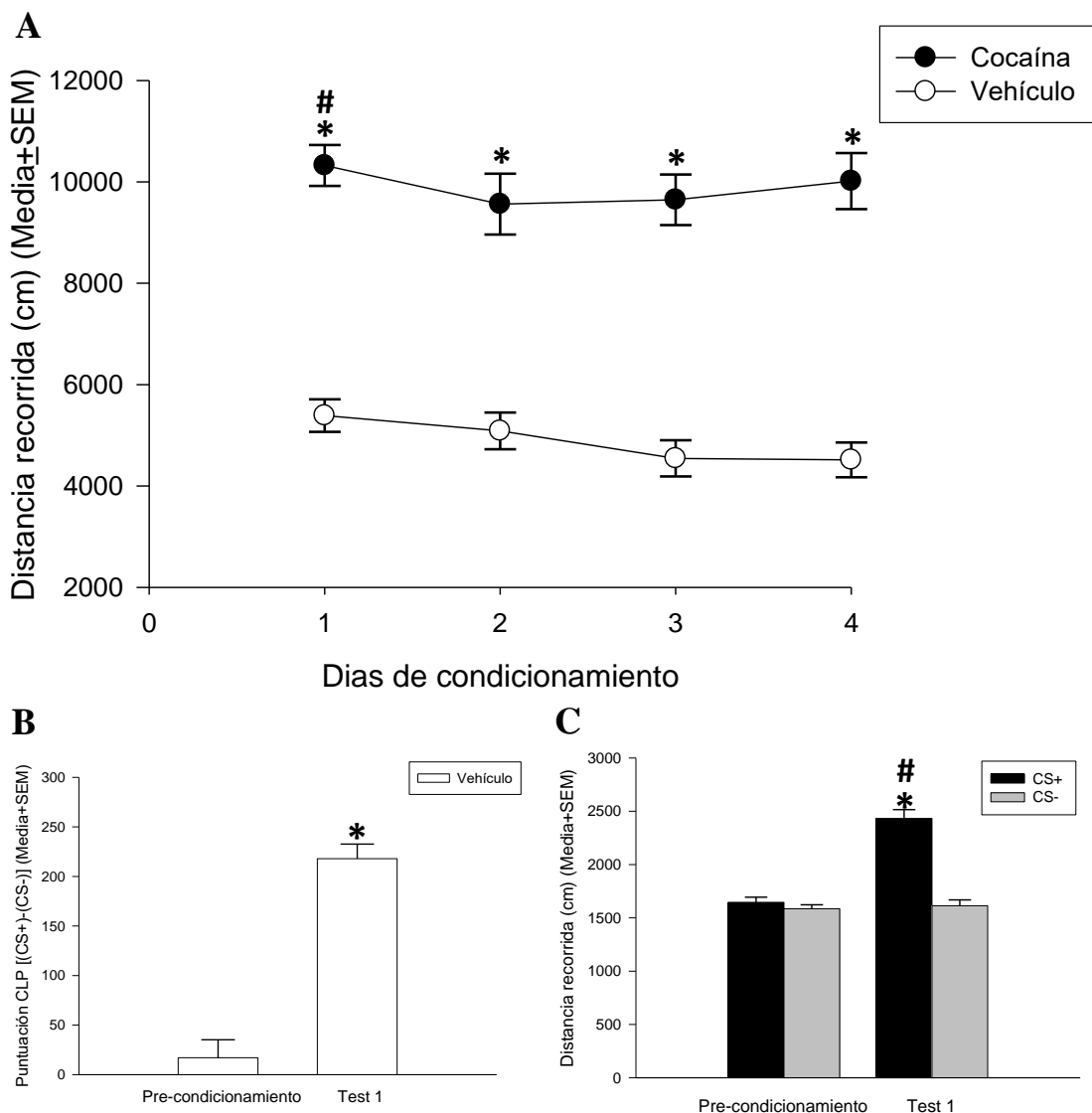


Figura 35. Condicionamiento de lugar preferencial y locomoción condicionada antes de la administración de los tratamientos. **A:** La gráfica representa la locomoción durante los distintos días de condicionamiento. Todos los animales presentaron una mayor locomoción en el ensayo en el que fueron tratados con cocaína en todos los días de condicionamiento. Además, los animales mostraron un aumento de la locomoción en el primer día de tratamiento con cocaína respecto al día 2 y 3 de condicionamiento. *Diferencia significativa respecto al ensayo con vehículo durante los cuatro días de condicionamiento ($p\leq 0,05$); #Diferencia significativa respecto al día 2 y 3 de condicionamiento ($p\leq 0,05$). **B:** La gráfica muestra la puntuación de CLP en el pre-condicionamiento y en el *Test*. Todos los animales mostraron una preferencia estadísticamente significativa por el compartimento asociado a droga en la sesión de *Test*. *Diferencia significativa respecto al pre-condicionamiento ($p\leq 0,05$). **C:** La gráfica representa la locomoción en cada compartimento en la sesión de pre-condicionamiento y en la sesión de *Test* 1. Todos los animales mostraron un aumento de la locomoción en el compartimento CS+ en el *Test* respecto al Pre-condicionamiento. Además, se observó una mayor locomoción en el compartimento CS+ que en el compartimento CS-

en la sesión Test 1. *Diferencia estadísticamente significativa respecto a CS+ en el pre-condicionamiento ($p \leq 0,05$); #Diferencia estadísticamente significativa respecto a CS- en el Test 1 ($p \leq 0,05$).

Cuando se analizó la distancia recorrida por compartimentos en el Test 1 respecto a la sesión de pre-condicionamiento, los resultados estadísticos mostraron diferencias significativas en función del día (efecto de “día”: $F(1, 34)=43,71$; $p \leq 0,001$), del compartimento (efecto de “compartimento”: $F(1, 34)=78,48$; $p \leq 0,001$) y de la interacción de ambas variables (efecto de “día x compartimento”: $F(1, 34)=196,56$; $p \leq 0,001$). En concreto, el análisis post hoc reveló un aumento significativo de la locomoción en CS+ en la sesión de Test 1 comparado con la locomoción en ese mismo compartimento durante el pre-condicionamiento ($p \leq 0,05$), pero no se observó dicho aumento en CS- ($p > 0,05$). Además, los animales presentaron una mayor locomoción en el compartimento asociado a la droga, en comparación al compartimento asociado a vehículo durante la sesión de Test 1 ($p \leq 0,05$) (Figura 35 C). Por lo tanto, estos resultados indican que los animales mostraron LC inducida por cocaína durante el Test 1.

2.2. Efecto del tratamiento agudo de PEA en el recuerdo del CLP y en la locomoción en el Test 2.

Cuando se analizó la puntuación obtenida de CLP en el Test 2 respecto al Test 1 no se encontraron diferencias significativas en función del tratamiento (efecto de “tratamiento”: $F(2, 32)=2,29$; $p > 0,05$) pero sí en función del día (efecto de “día”: $F(1, 32)=6,90$; $p \leq 0,05$), así como en la interacción entre ambas variables (efecto de “día x tratamiento”: $F(2, 32)=6,08$; $p \leq 0,01$). El análisis post-hoc reveló una reducción de la preferencia en el Test 2 con respecto al Test 1 en los grupos que recibieron una administración aguda de PEA a dosis de 1 y de 10 mg/kg ($p \leq 0,05$). Además, en el Test 2, el grupo tratado con PEA 10 mg/kg mostró una reducción significativa de la preferencia de lugar condicionada respecto al grupo tratado con vehículo ($p \leq 0,05$) (Figura 36). Estos resultados, en su conjunto, indican que la administración aguda de PEA a ambas dosis después de que se haya adquirido un aprendizaje de lugar preferencial inducido por cocaína, es capaz de bloquear la expresión de dicha preferencia, siendo más eficaz la dosis de 10 mg/kg.

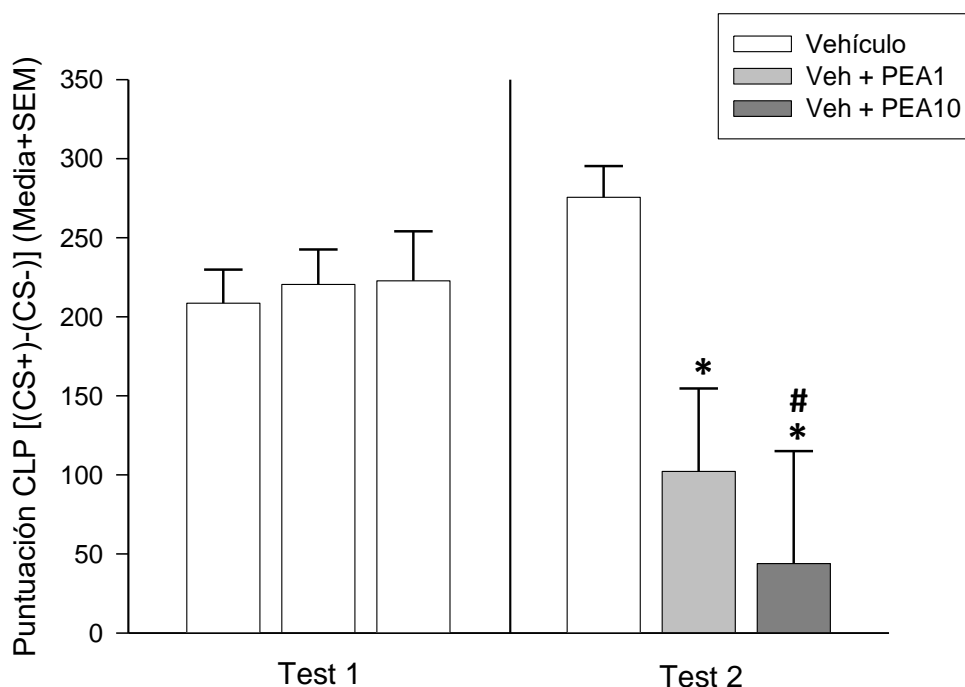


Figura 36. Puntuación de CLP inducido por cocaína. La gráfica muestra la puntuación de CLP en el Test 1 y en el Test 2 para cada tratamiento. Los grupos que en el Test 2 fueron tratados con PEA a ambas dosis (1 ó 10 mg/kg) presentaron un bloqueo en la expresión del condicionamiento de lugar preferente. Además, el grupo tratado con PEA 10 mg/kg tuvo una puntuación significativamente menor de CLP que el grupo tratado con vehículo en el Test 2. *Diferencia significativa respecto al Test 1 ($p \leq 0,05$); #Diferencia significativa respecto al grupo tratado con vehículo en el Test 2 ($p \leq 0,05$).

En cuanto a los resultados estadísticos de la locomoción por compartimentos durante el Test 2, se observaron diferencias significativas en función del tratamiento administrado (efecto de “tratamiento”: $F(2, 32)=3,68$; $p \leq 0,05$), del día (efecto de “día”: $F(1, 32)=83,54$; $p \leq 0,001$) y compartimento (efecto de “compartimento”: $F(1, 32)=124,43$; $p \leq 0,001$) así como de las interacciones de primer orden (efecto de “tratamiento x día”: $F(2, 32)=7,74$; $p \leq 0,01$); “tratamiento x compartimento”: $F(2, 32)=7,797$; $p \leq 0,01$); “día x compartimento”: $F(1, 32)=32,80$; $p \leq 0,001$); y segundo orden (efecto de “tratamiento x día x compartimento”: $F(2, 32)=4,18$; $p \leq 0,05$). El análisis de la interacción “tratamiento x día x compartimento” reveló que todos los grupos durante el Test 1, presentaban una mayor locomoción en el compartimento CS+ que en el compartimento CS- ($p \leq 0,05$). Sin embargo, durante el Test 2 se observó que tanto el grupo tratado con vehículo como el grupo tratado con vehículo + PEA 1 mg/kg recorrían significativamente más distancia en el compartimento CS+ que en el compartimento CS- ($p \leq 0,05$), algo que no sucedía en el grupo tratado con vehículo + PEA 10 mg/kg ($p > 0,05$). Además, también se observó que el grupo tratado con

vehículo + PEA 10 mg/kg redujo significativamente la locomoción en CS+ con respecto a los otros dos grupos ($p \leq 0,05$) (Figura 37 A).

El análisis estadístico realizado con la tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ en el Test 2 comparada con el Test 1 para ese mismo compartimento, reveló un efecto del tratamiento en la magnitud de dicho cambio (efecto de “tratamiento”: $F(2, 32) = 10,97$; $p \leq 0,001$) (Figura 37 B). El análisis post-hoc mostró una mayor tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ para el grupo tratado con PEA 10 con respecto a los otros dos grupos experimentales, reflejando así una reducción significativa de la locomoción en dicho compartimento durante la sesión de Test 2 ($p \leq 0,05$).

Estos resultados en conjunto, indican que el tratamiento con PEA a dosis de 10 mg/kg es capaz de bloquear o interferir con la expresión de la locomoción condicionada inducida por cocaína.

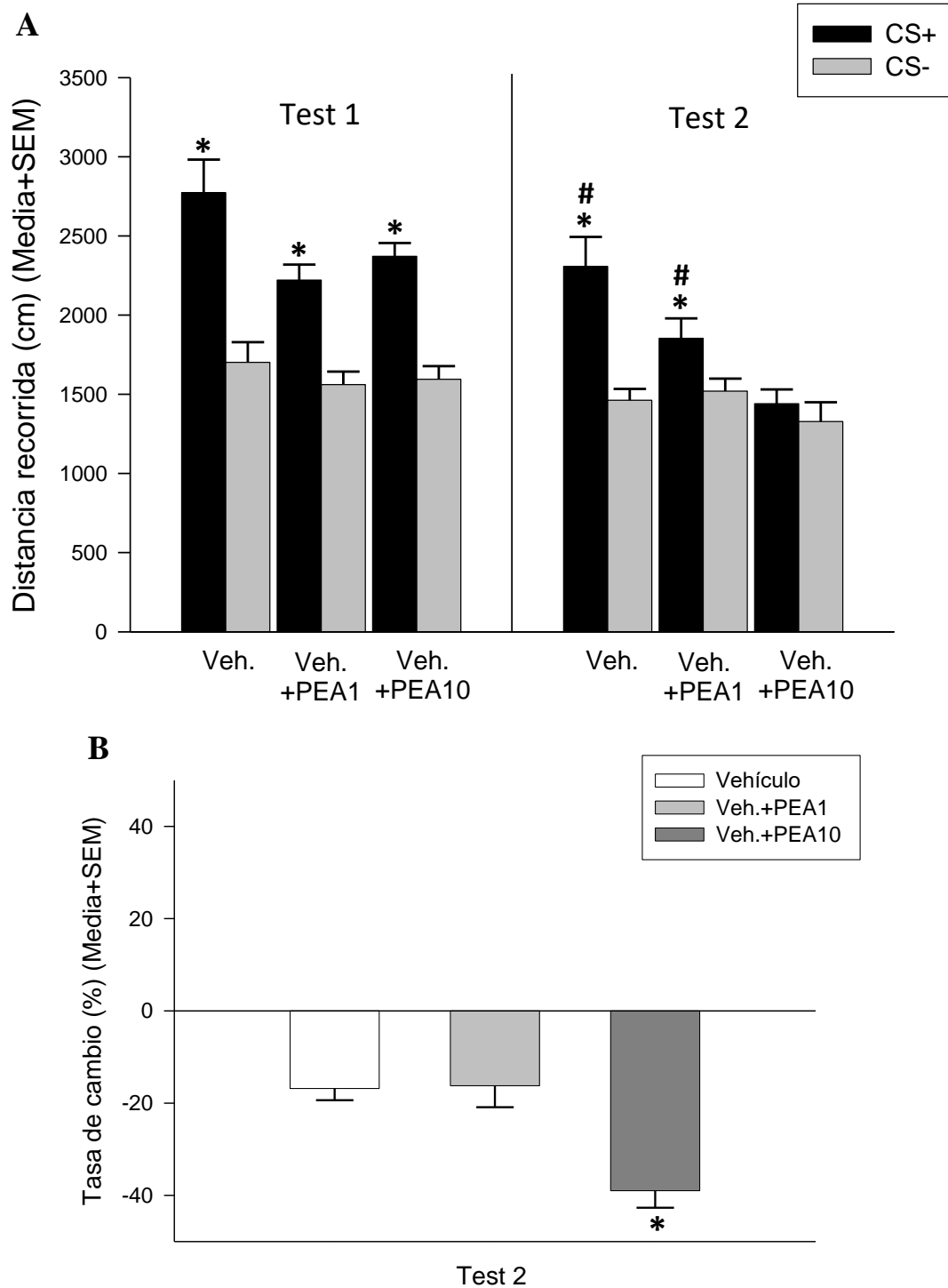


Figura 37. Locomoción por compartimentos y tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+ en el Test2 de CLP inducido por cocaína. A: La gráfica muestra la distancia recorrida en el Test 2 en cada compartimento, para cada tratamiento. Los grupos experimentales tratados con vehículo y con vehículo + PEA 1 presentaron una mayor locomoción en el compartimento CS+ que en el compartimento CS-. Además, estos grupos exhibieron un incremento de la locomoción en el compartimento CS+ que el grupo tratado con vehículo + PEA 10 mg/kg para ese mismo compartimento. *Diferencia significativa respecto a CS- ($p \leq 0,05$); #Diferencia significativa respecto al grupo tratado con PEA10 en el compartimento CS+ ($p \leq 0,05$). **B:** La gráfica muestra la tasa de cambio de la distancia recorrida en CS+, para cada tratamiento. El grupo tratado con vehículo + PEA 10 exhibió una tasa de cambio

significativamente mayor que el resto de grupos experimentales. *Diferencia significativa respecto a los demás grupos experimentales ($p \leq 0,05$).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo VII:

DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DISCUSIÓN

Efecto de la PEA en la actividad exploratoria y en las pruebas neurológicas en ausencia de cocaína.

Conocer la influencia que pueda tener un tratamiento determinado sobre el patrón conductual normal de los animales, así como sobre la capacidad de respuesta de distintos reflejos, es crucial cuando se inician estudios comportamentales. En primer lugar, para evaluar el efecto de la PEA a dosis de 1 ó 10 mg/kg administrada de forma aguda sobre la actividad exploratoria que pudiera indicar cambios emocionales relacionados con la ansiedad empleamos la prueba del laberinto de hoyos y el laberinto elevado en cruz. Los resultados de la prueba del laberinto de hoyos revelaron la preservación del patrón exploratorio normal de los animales tratados con PEA a ambas dosis, ya que todos los animales mostraron una tendencia a explorar los hoyos situados en la zona periférica así como recorrer una distancia mayor en la periferia que en el centro del laberinto. Si bien, el tratamiento con PEA a dosis de 10 mg/kg provocó una reducción general tanto en la frecuencia de exploración de los hoyos como en la locomoción total. Además, en este mismo grupo se observó una reducción en la frecuencia de exploración vertical.

Los resultados obtenidos en el laberinto elevado en cruz indicaron que ninguna de las dos dosis empleadas PEA afectó a la conducta relacionada con la ansiedad, dado que no se encontraron diferencias en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, en el número de entradas a los brazos abiertos ni en la latencia de entrada a uno de estos brazos. Estos datos correlacionan con los resultados obtenidos en el laberinto de hoyos, puesto que los animales tratados con PEA exploraron preferentemente la zona periférica, al igual que los animales tratados con vehículo, lo que indica que no se produjo ninguna alteración emocional relacionada con el grado de ansiedad. También se observó una reducción de la distancia recorrida y en la velocidad en el grupo tratado con PEA 10 mg/kg. En cuanto a las conductas evaluadas en el laberinto elevado en cruz, una vez más se observó una reducción de la frecuencia de exploración vertical y de conductas de valoración de riesgo en los animales tratados con PEA 10 mg/kg. En cambio, el tratamiento con PEA no afectó a la emisión de las conductas de acicalamiento, ni de *head-dipping*.

Por lo tanto, en ambas pruebas se demostró que la PEA no interfiere en el patrón exploratorio normal de los animales, lo cual indica que no se ve afectado el grado de ansiedad pero sí se observa un probable efecto hipolocomotor producido por el tratamiento agudo de PEA 10 mg/kg. Aunque estudios previos han demostrado la capacidad de PEA de producir efectos ansiolíticos y antidepresivos en distintos modelos experimentales (Coppola y Mondola, 2014; Crupi et al., 2013; Guida et al., 2015; Yu et al., 2011) dichos resultados se obtuvieron después de un tratamiento crónico con PEA, lo cual puede explicar que nosotros no obtuviéramos estos mismos efectos con la administración aguda.

Respecto al efecto hipolocomotor, aunque no se ha descrito en estudios previos con PEA, sí está ampliamente documentado que altas dosis de AEA provocan una reducción en la locomoción horizontal (Bruijnzeel et al., 2016; Panlilio et al., 2009; Scherma et al., 2008), así como una disminución en la frecuencia de exploración vertical y conducta de acicalamiento (Bruijnzeel et al., 2016; de Lago et al., 2004; Romero et al., 1995). En cambio, la administración de dosis bajas de AEA provoca un incremento de la locomoción, por lo que el efecto de la AEA va a depender de la dosis empleada (Sulcova et al., 1998). La disminución de la conducta motora general producida por la AEA se encuentra mediada por los receptores TRPV1 (Panlilio et al., 2009), puesto que la administración de un antagonista para dicho receptor es capaz de bloquear estos efectos (de Lago et al., 2004; Panlilio et al., 2009). Además, la activación de este receptor por la administración de capsaicina es capaz de reducir la actividad motora espontánea en exploración vertical y el acicalamiento e incrementar el tiempo de inmovilidad (Proulx et al., 2005). Los receptores TRPV1 se encuentran altamente distribuidos en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, región involucrada en la regulación de la actividad motora (Mezey et al., 2000). De acuerdo con estos datos, también se ha observado que la administración de AEA provoca una disminución de la actividad dopaminérgica en el sistema nigroestriatal (de Lago et al., 2004; Romero et al., 1995) mediado por el receptor TRPV1, lo que explicaría la reducción motora inducida por AEA (de Lago et al., 2004).

Mediante la administración de otras acetilcolinámicas, como la OEA, también se ha observado un efecto reductor de la locomoción (Proulx et al., 2005; Rodríguez de Fonseca et al., 2001), así como una disminución de la actividad espontánea (exploración

vertical y acicalamiento) y un aumento del tiempo de inmovilidad tras el tratamiento con OEA y con el agonista de PPAR α , Wy-14643 (Proulx et al., 2005).

Por otro lado, se ha comprobado en estudios *in vitro* que la activación del receptor TRPV1 induce la producción de AEA, OEA y PEA (Di Marzo et al., 2001), por lo que es posible que la regulación de la actividad locomotora se produzca mediante la activación de PPAR α por ligandos endógenos (AEA, OEA y PEA inducidos por agonistas del receptor TRPV1) o por ligandos exógenos (Wy-14643). Es difícil saber si el efecto hipolocomotor producido por PEA se debe a la activación de TRPV1 y/o de PPAR α , por lo que se hace necesario el desarrollo de estudios en los que se bloquee la activación de PPAR α de forma conjunta con la administración PEA.

Por último, los resultados obtenidos mediante la exploración neurológica demostraron la preservación de la capacidad de respuesta de los diferentes reflejos sensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora evaluados tras la administración de PEA. En concreto, cuando las pruebas se desarrollaron a los 5 minutos después de la administración de PEA, ninguna de las dos dosis empleadas produjo una afectación neurológica destacable. Únicamente se observó una alteración leve en el reflejo somatosensorial de sobresalto, afectando tan solo al 14,2% y al 11,1% de los animales tratados con PEA 1 y PEA 10 mg/kg, respectivamente. También se observó una afectación leve en un 25% de los animales tratados con PEA 10 en el reflejo de equilibrio. En primer lugar, es importante destacar que dichos porcentajes son indicativos de un número muy reducido de animales, y además, no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control. En segundo lugar, el 11,1% de los animales del grupo control tratados con vehículo mostraron una afectación grave para el reflejo de sobresalto y una alteración leve en el reflejo de equilibrio. Por lo tanto, no podemos confirmar que el escaso número de animales tratados con PEA que mostraron una afectación leve de ambos reflejos fuera debida al tratamiento recibido.

Los resultados de las pruebas neurológicas realizadas a los 30 min. de la administración de PEA revelaron una preservación general de los reflejos evaluados. Sin embargo, a nivel sensorial el tratamiento con PEA 10 mg/kg produjo una afectación grave en el 37,5% de los animales en la prueba del pinchazo y en el 25% de los animales en el reflejo de sobresalto. También se observó a nivel motor y de coordinación sensorio-motora una alteración grave en el 25% y 12,5% de los animales

tratados con PEA 10 en el reflejo de equilibrio y en el reflejo de extensión, respectivamente. Aunque los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas con el grupo control, hay que tener en cuenta que el tratamiento con PEA 10 puede producir estas alteraciones a nivel neurológico. En cuanto a los resultados de la prueba de pinchazo, esta afectación puede estar justificada por el efecto analgésico producido por PEA (Gatti et al., 2012; Paladini et al., 2016), siendo eficaz a partir de su concentración a 10 mg/kg (Guida et al., 2015). Las alteraciones observadas en el reflejo de equilibrio y en el de extensión pueden estar relacionadas con la disminución de la actividad motora explicada anteriormente para las pruebas del laberinto de hoyos y el laberinto elevado en cruz.

Cabe destacar que gracias a estos datos preliminares podemos estar seguros de que los resultados de las pruebas realizadas posteriormente para evaluar la implicación de PEA en la adicción a cocaína no se ven contaminadas por ningún efecto en la conducta exploratoria normal, en el estado emocional basal, ni en la capacidad de respuesta refleja de los animales.

Efecto de la PEA en la LC y en la SC inducida por cocaína.

La SC consiste en el incremento exponencial del efecto activador de la locomoción después de la administración repetida de cocaína (Robinson y Berridge, 2003). Este aumento de los efectos estimulantes de la droga se debe a neuroadaptaciones producidas por el consumo de la droga, que van a ser fundamentales en el mantenimiento de la conducta adictiva (T. J. De Vries et al., 1998). En cambio, la LC se produce en un estado libre de droga y se manifiesta como un incremento en la actividad locomotora al reexponer al animal a las claves o estímulos contextuales previamente asociados con el consumo de cocaína. Tanto la SC como la LC están directamente relacionadas con la instauración del proceso de dependencia y el mantenimiento de la conducta adictiva a esta droga de abuso, por lo que se hace necesario el estudio de fármacos capaces de bloquear o reducir estas respuestas, así como las neuroadaptaciones que subyacen a las mismas. En este sentido, hemos diseñado dos experimentos que nos permitieran evaluar el efecto de la PEA en las respuestas de adquisición y expresión de SC y LC inducidas por cocaína.

Antes de iniciar cualquier procedimiento experimental es necesario conocer el efecto del tratamiento a emplear en un estado libre de droga. Para ello se evaluó la locomoción basal en la prueba de campo abierto después de la administración aguda de PEA a ambas dosis (1 o 10 mg/kg) o vehículo. Los resultados mostraron una reducción significativa de la locomoción basal con el tratamiento de la dosis más alta de PEA, resultado que ya esperábamos debido al efecto motor descrito tanto en OEA como en AEA en estudios previos (Panlilio et al., 2009; Proulx et al., 2005; Rodríguez de Fonseca et al., 2001). Aún no está claro el mecanismo implicado en la producción de dicho efecto aunque parece ser mediado por la participación de los receptores diana de la PEA, estos son el receptor TRPV1 y PPAR α , actuando de forma conjunta o a través de un mecanismo indirecto por el que la activación de TRPV1 aumenta la producción de acilatanolamidas que, consecuentemente actuarían sobre PPAR α (Di Marzo et al., 2001; Proulx et al., 2005).

Es importante destacar que durante la fase de condicionamiento con administraciones repetidas de cocaína 20 mg/kg, la PEA no afectó ni disminuyendo ni potenciando la locomoción inducida por esta droga, por lo que parece que la cocaína es capaz de revertir el efecto hipolocomotor de PEA. Según los resultados obtenidos,

ambas dosis de PEA administradas de forma repetida durante el condicionamiento fueron capaz de bloquear la adquisición de la LC y de la SC inducida por cocaína, ya que en ambas pruebas los grupos pretratados con PEA + cocaína exhibieron una locomoción significativamente menor que el grupo pretratado sólo con cocaína, y además no mostraron mayor locomoción que el grupo vehículo. Podemos confiar en que esa reducción de la locomoción no se debe al efecto hipolocomotor producido por PEA, ya que ésta fue administrada durante el condicionamiento y no previo a las sesiones de LC y SC. Tampoco se debe al efecto repetido de PEA en la fase de condicionamiento, ya que otros estudios empleando las mismas dosis que nosotros, e incluso superiores (20 mg/kg), durante tiempos más prolongados, han observado un aumento de la locomoción en campo abierto (Crupi et al., 2013) y una reducción de la inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola (Crupi et al., 2013; Yu et al., 2011).

Cuando la PEA fue administrada de forma aguda antes de la sesión de LC, el grupo tratado con PEA 10 mostró una locomoción significativamente menor que los grupos pre-tratados con cocaína que recibieron una administración de vehículo o de PEA 1 previa al test de LC, así como una locomoción mayor que el grupo pre-tratado con vehículo. Por lo tanto, estos resultados indican que el tratamiento con PEA a dosis de 10 mg/kg fue capaz de reducir la expresión de la LC inducida por cocaína, siendo ineficaz la dosis de 1 mg/kg de PEA. En esta prueba, en la cual se administró PEA en un estado libre de droga, podemos confiar en que la disminución de la distancia recorrida durante el test no se debe al efecto hipolocomotor producido por PEA a dosis de 10 mg/kg descrito previamente, ya que los datos obtenidos en la sesión de locomoción basal con dicho tratamiento mostraron una distancia recorrida significativamente menor que en el día del test de LC.

En cuanto a la prueba de SC, el grupo tratado con “*priming*” de cocaína mostró una locomoción significativamente mayor que el resto de los grupos experimentales, no observándose diferencias entre los grupos tratados con “*priming*” de cocaína más PEA a ambas dosis y el grupo control que recibió una administración aguda de cocaína. Estos resultados indican que la administración aguda de PEA a dosis de 1 y 10 mg/kg bloqueó la expresión de la SC inducida por cocaína.

La SC es considerada un modelo de plasticidad neuronal (Nestler, 2001) puesto que las neuroadaptaciones que se producen durante el consumo de drogas son

responsables de la expresión de la SC (Nestler, 2001; Robinson y Berridge, 1993). Las estructuras implicadas en esta respuesta conductual son el NAcc, la CPF, la amígdala y el estriado dorsal, es decir, aquellas pertenecientes al bucle corticoestriatoamigdalino (Pierce y Kalivas, 1997). Además, se ha encontrado que tanto ratones *wild-type* como *knockout* para el receptor PPAR α , son capaces de experimentar de forma similar la respuesta de SC inducida por cocaína, por lo que parece que este receptor no participa en la expresión de esta respuesta conductual (Bilbao et al., 2013; Fernandez-Espejo et al., 2009). Por lo tanto, puede que PEA esté bloqueando la adquisición y expresión de la SC con independencia del receptor PPAR α , pudiendo estar implicado en estos efectos el receptor TRPV1 que, como se comentó anteriormente, está ampliamente distribuido en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Mezey et al., 2000). Dado que el estriado dorsal es una estructura fundamental en el mantenimiento de los hábitos motores y en la expresión de la SC, esta región puede ser clave en los efectos producidos por PEA. Al igual que la administración de AEA produce una reducción de la actividad de neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal a través del receptor TRPV1 (de Lago et al., 2004; Romero et al., 1995) es posible que la capacidad de PEA en bloquear la expresión de la SC estén mediados por la activación del receptor TRPV1 en el estriado dorsal y sustancia negra. Además de estas dos regiones, este receptor se expresa en la amígdala central, responsable de mediar los efectos reforzantes de la cocaína (Caine et al., 1995), por lo que puede estar funcionando como una diana de PEA para interferir en el refuerzo percibido tras el consumo repetido de cocaína y, reducir así la SC inducida por la droga.

También se ha descrito que el receptor TRPV1 se expresa en el giro dentado del hipocampo (Mezey et al., 2000). Esta información es bastante relevante para poder comprender el papel de la PEA en la reducción de la LC. Dado que la LC inducida por cocaína es una respuesta que se produce al exponer al animal al contexto asociado a droga, se trata de un aprendizaje contextual en el que el hipocampo juega un papel fundamental. Por lo tanto, la PEA podría estar actuando sobre los receptores TRPV1 situados en el hipocampo bloqueando la adquisición de la asociación contextual a la droga, como ocurre cuando la PEA es administrada durante el condicionamiento a cocaína, o reduciendo la expresión de dicho aprendizaje al ser administrada de forma aguda antes de la sesión de LC.

En resumen, la PEA ha mostrado ser eficaz en reducir y bloquear tanto la expresión de la LC y la SC inducida por cocaína. Aunque aún no conocemos exactamente las vías por las cuales es capaz de producir dichos efectos, cada vez son más los estudios que parecen señalar al receptor TRPV1, excluyendo al receptor PPAR α en mediar las acciones de la PEA. Por lo tanto, se necesitan más investigaciones para identificar los mecanismos a través de los cuales la PEA produce esta acción inhibitoria sobre las respuestas de LC y SC inducidas por cocaína. Ya que la LC y la SC son fundamentales en el mantenimiento de la adicción, la PEA puede contribuir en el desarrollo de tratamientos farmacológicos de la dependencia a cocaína.

Efecto de la PEA en el CLP inducido por cocaína.

El modelo de CLP es un procedimiento basado en el condicionamiento clásico que ha sido ampliamente utilizado en la investigación de las adicciones a distintas drogas de abuso, ya que permite analizar los efectos reforzantes o aversivos de las mismas (Katz y Gormezano, 1979). Este procedimiento consiste en asociar aquellos efectos gratificantes de las drogas a un contexto determinado, por lo que la adquisición de la preferencia, su expresión y el mantenimiento de la conducta de búsqueda de droga, así como la recaída se ve influida por estas asociaciones. Comprobando la importancia que tiene el contexto en la conducta adictiva, se hace necesario el descubrimiento de nuevos fármacos que interfieran en la formación de este condicionamiento o que sean capaces de bloquear o interferir en estas asociaciones una vez se hayan establecido. En este estudio se ha evaluado la influencia de la PEA en la adquisición y expresión del CLP inducido por cocaína, por lo que se han diseñado dos experimentos distintos que permitieran discernir cada uno de los efectos de la PEA.

En primer lugar, se analizó si la PEA administrada durante la fase de condicionamiento interfería en la adquisición del CLP inducido por cocaína. Es importante destacar que la administración de PEA junto con cocaína durante el condicionamiento no modificó la locomoción inducida por cocaína. Estos datos coinciden con los obtenidos en el primer experimento de sensibilización conductual, por lo que en ninguno de los modelos experimentales empleados en esta tesis se observa

ningún efecto durante la coadministración repetida de PEA y cocaína sobre el aumento de la locomoción inducida por este psicoestimulante.

El tratamiento repetido con la PEA tampoco afectó a la adquisición del CLP, ya que todos los grupos experimentales, independientemente del tratamiento recibido durante el condicionamiento, mostraron preferencia durante la prueba de CLP por el compartimento asociado a la droga. Si bien es cierto que se observa un ligero aumento en la puntuación obtenida de CLP en el grupo pre-tratado con cocaína+PEA 10 respecto al resto de grupos experimentales que, aunque no llega a ser estadísticamente significativo, puede ser el resultado del efecto de PEA en la potenciación del aprendizaje asociativo. Estudios recientes han demostrado la capacidad de OEA (Campolongo et al., 2009), así como de inhibidores de la FAAH (Mazzola et al., 2009), para incrementar el proceso de consolidación de la memoria en ratas a través del receptor PPAR α . La inmunolocalización de este receptor en el cerebro adulto de rata en estructuras implicadas en procesos de aprendizaje, como por ejemplo el hipocampo y la amígdala, sugiere que PPAR α puede tener funciones específicas en procesos de aprendizaje y memoria (Moreno et al., 2004). Además, la inactivación selectiva de la FAAH aumenta los niveles endógenos de PEA, OEA y AEA (Piomelli et al., 2006), por lo que, aunque estos efectos no se han demostrado directamente en PEA, puede que esta aciletanolamida tenga un papel importante en la formación de aprendizajes asociativos de tipo contextual como los que participan en el CLP. En este trabajo, todos los grupos mostraron una respuesta de LC el día del test, siendo mayor en el grupo pre-tratado con PEA 10 mg/kg respecto al grupo pre-tratado con cocaína. Además, los animales pre-tratados con PEA 10 exhibieron mayor tasa de cambio que el resto de los grupos experimentales en la locomoción recorrida en el compartimento asociado a droga el día del test respecto al pre-condicionamiento. Al igual que en la puntuación de CLP, esto puede deberse al efecto potenciador de la memoria producido por la acción de la PEA a nivel cerebral.

En un estudio previo, se observó que la administración repetida de OEA durante el condicionamiento bloqueaba el desarrollo de SC inducido por cocaína, así como la adquisición de CLP y LC (Bilbao et al., 2013). Además, estos efectos parecen ser independientes del receptor PPAR α , ya que no se encontraron diferencias con respecto a ratones KO para dicho receptor (Bilbao et al., 2013). A pesar de que la PEA y la OEA

sean moléculas que comparten vías de síntesis y degradación comunes, así como mecanismo de acción similares, existen algunos estudios que muestran algunas diferencias entre ambas. De este modo, se han observado variaciones diurnas en los niveles de OEA y PEA en distintas regiones del cerebro (Murillo-Rodríguez et al., 2006). En concreto, en el hipocampo, región muy importante en nuestro estudio dado la implicación que tiene en la formación de aprendizajes espaciales, se ha observado un incremento endógeno de PEA al comienzo del ciclo de oscuridad, mientras que la OEA endógena no muestra variaciones en función del ciclo (Murillo-Rodríguez et al., 2006). Por lo tanto, puede que ambas moléculas ejerzan un efecto diferente en el hipocampo, lo que explicaría los resultados contradictorios obtenidos en el modelo de CLP tras la administración repetida de OEA o de PEA.

En cuanto a los efectos producidos por OEA o PEA administrados junto con cocaína durante la fase de condicionamiento, otro estudio ha demostrado que ambas aciletanolamidas muestran un efecto vasodilatador por sí mismas, además de potenciar la vasodilatación producida por la AEA (Ho et al., 2008). En este caso, el mecanismo por el cual se observan estos efectos difiere de una molécula a otra. Así, sabemos que el receptor TRPV1 es el responsable de la vasodilatación producida por OEA sola o en combinación con AEA. En cambio, antagonizando dicho receptor se bloquean los efectos potenciadores de PEA en la vasodilatación producida por AEA, pero no se ve afectado el efecto de PEA administrada de forma aislada (Ho et al., 2008). Por lo tanto, ya que la cocaína es capaz de incrementar la presión arterial (Lizasoain et al., 2002), es posible que ambas moléculas actúen de forma diferencial sobre este efecto y, en consecuencia, produzcan respuestas comportamentales diferentes durante el desarrollo de la SC en la fase de condicionamiento con cocaína.

En resumen, en nuestro estudio encontramos que la administración repetida de PEA durante la fase de condicionamiento no interfiere en la hiperlocomoción producida por la cocaína, ni en la adquisición del CLP y LC inducida por esta droga. Además, se observa un ligero incremento en la preferencia de lugar condicionada, así como un aumento estadísticamente significativo de la LC en el grupo pre-tratado con PEA 10 mg/kg respecto al resto de grupos, lo que parece indicar que el tratamiento con PEA a esta dosis durante el condicionamiento potencia la asociación establecida entre los efectos reforzantes de la droga y un contexto específico. Dado que se han observado

variaciones en función del ciclo de luz-oscuridad en los niveles de PEA en el hipocampo (Murillo-Rodríguez et al., 2006) así como una alta distribución del receptor PPAR α en esta estructura (Moreno et al., 2004), puede que PEA actúe sobre estos receptores a nivel hipocampal para ejercer funciones específicas en procesos de aprendizaje y memoria contextual.

En el segundo experimento se evaluó el efecto de la PEA en la expresión del CLP inducido por cocaína una vez que los animales ya habían adquirido correctamente dicho condicionamiento. Para ello se realizó un Test 1 libre de droga y, al día siguiente, los animales se sometieron a un Test 2 en el que recibieron una administración previa de PEA (1 ó 10 mg/kg) o vehículo. Los resultados mostraron que en el primer test todos los animales preferían el compartimento asociado a la droga y exhibieron LC en dicho compartimento, mientras que en el Test 2 la administración aguda de PEA a ambas dosis fue capaz de bloquear la expresión del CLP y, además, PEA 10 anuló la expresión de la LC inducida por cocaína.

La expresión del CLP puede entenderse como una conducta motivacional de deseo de búsqueda de la droga, ya que el animal acude al contexto asociado con el consumo de cocaína para experimentar de nuevo los efectos reforzantes previamente obtenidos en este lugar específico. La participación del hipocampo es imprescindible en la formación de este tipo de aprendizaje espacial relacionado con el consumo de drogas (Hernández-Rabaza et al., 2008; Meyers et al., 2006). De acuerdo con esto, se ha demostrado que la inactivación funcional o la lesión del hipocampo dorsal perjudica tanto la adquisición como la expresión del CLP inducido por cocaína (Meyers et al., 2003, 2006). Además, las lesiones en el giro dentado del hipocampo bloquean la adquisición de un condicionamiento de lugar preferencial inducido por cocaína (Hernández-Rabaza et al., 2008). Las conexiones que se establecen entre el hipocampo ventral y el NAcc *shell* después del tratamiento repetido con cocaína parecen ser fundamentales en el incremento de la transmisión dopaminérgica inducida por señales que promueven la conducta de búsqueda de droga y el aumento de la respuesta condicionada inducida por cocaína (Barr et al., 2014).

Otra estructura importante en la conducta compulsiva de búsqueda de droga es el estriado dorsal (Everitt et al., 2008), donde el incremento de DA es fundamental durante la conducta de búsqueda de cocaína (Ito et al., 2002; Murray et al., 2014). Es posible

que la administración aguda de PEA pueda modificar la neurotransmisión dopaminérgica en el hipocampo y en la vía nigroestriatal, bloqueando de esta forma la expresión de CLP y de la LC inducida por cocaína, aunque no se dispone actualmente de estudios previos que expliquen la forma de activación de esta aciletanolamida sobre los receptores dopaminérgicos en esta vía que puedan confirmar esta hipótesis.

En cuanto al mecanismo de acción de la PEA para producir dichos efectos, aunque no sabemos con certeza sobre qué receptores actúa para bloquear la expresión del CLP y de la LC, parece que son independientes de la participación del receptor PPAR α . En primer lugar, sabemos que los ratones *knockout* para el receptor PPAR α desarrollan SC inducida por cocaína (Bilbao et al., 2013; Fernandez-Espejo et al., 2009). En segundo lugar, los ratones *knockout* para dicho receptor adquieren el CLP de forma similar que ratones *wild-type* (Bilbao et al., 2013). Estos resultados indican que la respuesta psicomotora y el efecto reforzante de la cocaína se producen por mecanismos independientes al receptor PPAR α . Una posible diana que medie estos efectos de PEA puede ser el receptor TRPV1. Como ya se ha descrito anteriormente, este receptor se distribuye ampliamente en hipocampo, estriado y sustancia negra, entre otras estructuras cerebrales (Mezey et al., 2000). Dada la importancia del hipocampo así como de la vía nigroestriatal en mediar la adquisición y expresión del CLP y de la LC inducida por cocaína, es posible que la PEA actúe sobre los receptores TRPV1 situados en estas regiones impidiendo la asociación contextual a la droga y, por tanto, bloqueando la expresión de dichas respuestas aprendidas.

Por último, la PEA puede ejercer algunos de sus efectos, como es el caso de su acción anti-inflamatoria y antinociceptiva, de forma indirecta a través de los receptores CB1 (Borrelli et al., 2015; Costa et al., 2008) y CB2 (Borrelli et al., 2015; Calignano et al., 1998; Costa et al., 2008). Esta activación de los receptores CBs parece que se produce debido a que AEA y PEA compiten por la hidrólisis de FAAH, por lo que tras la administración de PEA aumentarían los niveles endógenos de AEA que serían los responsables de activar los receptores CB1 y CB2 (revisado en Re et al., 2007). Dado que la AEA también es un agonista capaz de activar canales iónicos para el receptor TRPV1, algunos de los efectos de la PEA a través de este receptor parecen estar mediados por este mismo mecanismo (Ho et al., 2008; Zygmunt et al., 1999). Además, la PEA podría actuar como un modulador alostérico aumentando la capacidad de unión

de AEA a TRPV1 (Ho et al., 2008). Por lo tanto, el bloqueo de la expresión del CLP y de la LC podría producirse debido al incremento de los niveles endógenos de AEA que activarían los receptores endocannabinoides.

En los últimos años, se han desarrollado diversos trabajos que han demostrado la implicación del sistema endocannabinoide en la regulación de la conducta adictiva. Se han realizado estudios con animales que demuestran cómo el bloqueo de receptores CB1 con el antagonista SR 141716 puede producir una disminución en el deseo por consumir alcohol y heroína (Colombo et al., 2004; Solinas et al., 2003). En cambio, este bloqueo no alteró la autoadministración de cocaína (De Vries et al., 2001). Se ha demostrado que la activación de receptores CB1 por el agonista sintético WIN55212-2 produce una reducción en la autoadministración de cocaína, que podría deberse a los propios efectos reforzantes positivos del agonista cannabinoide (Fattore et al., 1999). En este sentido, la pre-exposición a delta-9-THC en ratas parece incrementar los efectos anxiogénicos de la cocaína y así reducir el valor reforzante de la misma (Panlilio et al., 2007). En la actualidad, se han desarrollado modelos animales que tratan de mimetizar estados del proceso de adicción a cocaína, a diferencia de aquellos que se centran en reproducir solo los efectos reforzantes (Ahmed y Koob, 1998). Así, se ha observado que el bloqueo de receptores CB1 con SR141617 reduce la toma compulsiva de cocaína en un modelo de auto-administración con acceso prolongado (6 horas). Por lo tanto, el receptor CB1 estaría más implicado en estados avanzados de la dependencia a cocaína, modulando aspectos relacionados con la compulsividad y la motivación incrementada que muestran los animales dependientes a cocaína (Orio et al., 2009).

En cuanto al modelo de CLP, se ha demostrado que la administración del antagonista de los receptores CB1, SR 141716, bloquea la adquisición, pero no la expresión del CLP inducido por cocaína en ratas (Chaperon et al., 1998) y perjudica la adquisición y la reinstauración del CLP inducido por cocaína en ratones (Yu et al., 2011). En un estudio, la administración sistémica o en la CPFm del antagonista CB1 después de cada ensayo, perjudicó la consolidación del CLP inducido por dosis altas de cocaína (20 y 40 mg/kg) y, además, facilitó la extinción del CLP (Hu et al., 2015). También se ha demostrado que la administración de agonistas CB1 producen condicionamiento de aversión de lugar (Chaperon et al., 1998; Cheer et al., 2000; McGregor et al., 1996).

Cabe destacar un estudio reciente en el que se investiga la posible interacción entre los receptores CB1 y CB2 para modular los efectos de la cocaína. En concreto, en el citado trabajo se comprobó que antagonizando el receptor CB1 se reducía la hiperlocomoción, el incremento de c-Fos en NAcc *shell* y *core*, así como se inhibía la adquisición de CLP inducido por cocaína. Además, la administración de un antagonista CB2 era capaz de revertir todos estos efectos producidos por el antagonista del receptor CB1. En este mismo estudio, se administró un agonista del receptor CB2 de forma aislada, el cuál a dosis altas fue capaz de bloquear la hiperlocomoción inducida por cocaína. Por último, se inhibió la hidrólisis de endocannabinoides, lo cual no tenía ningún efecto sobre las acciones de la cocaína si no se administraba de forma conjunta con el antagonista del receptor CB1 (Gobira y Moreira, 2015). Por lo tanto, parece que el bloqueo del receptor CB1 dirige a los endocannabinoides para actuar sobre el receptor CB2, en los cuales ejercen sus efectos para modificar las acciones inducidas por cocaína. Esta información es bastante relevante para nuestro estudio, ya que demuestra que no solo el bloqueo de los receptores CB1 es capaz de bloquear la adquisición del CLP, sino que es necesaria la activación conjunta de los receptores CB2 para que se produzca este efecto. Dado que la administración de PEA puede aumentar los niveles endógenos de AEA, ésta podría activar los receptores CB2 mimetizando dicho efecto.

Estudios recientes desarrollados con humanos, han demostrado un incremento de las aciletanolamidas en pacientes tras abstinencia del consumo de cocaína comparado con sujetos que nunca han consumido drogas observándose, además, un aumento de PEA y OEA en plasma de personas con historia de consumo de cocaína que correlaciona con el diagnóstico de trastornos del estado de ánimo (Pavón et al., 2013). Debido a que existen diferencias de género en el proceso de la dependencia a la droga, recaída y respuesta a la terapia, deberían considerarse las variaciones en función del género en la detección de biomarcadores de la adicción. De esta forma, se ha comprobado que las mujeres en abstinencia de consumo de cocaína, además de tener mayor prevalencia de comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos, muestran mayores niveles en plasma de palmitoleoiletanolamida (POEA) (Pedraz et al., 2015). Estos estudios indican que las aciletanolamidas muestran variaciones en sus concentraciones en plasma en sujetos con historia de consumo de cocaína que, además es dependiente del género y presenta comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos.

Por lo tanto, la detección de marcadores biológicos podría ser básica para un diagnóstico precoz del trastorno por consumo de sustancias como la cocaína (DSM-5) y su tratamiento en fases iniciales.

En resumen, nuestro estudio demuestra la efectividad de la administración aguda de PEA para bloquear la expresión del CLP y de la LC inducida por cocaína. Este efecto observado de la PEA puede deberse a su acción directa sobre receptores TRPV1 localizados en la región hipocámpal y en la vía nigroestriatal, o bien de forma indirecta, incrementando los niveles endógenos de AEA que activaría los receptores CB2 y modularían las respuestas conductuales inducidas por cocaína. Ya que la expresión del CLP puede entenderse como una conducta asociada a la búsqueda de la droga, la cual resulta mediada por un papel claramente motivacional, podríamos concluir que la PEA está bloqueando los mecanismos motivacionales relacionados con el consumo de cocaína y, por lo tanto, podría ser un tratamiento farmacológico eficaz para reducir la recaída en personas con dependencia a este psicoestimulante.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo VIII:

CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CONCLUSIONES

1. La administración aguda de PEA a dosis intermedia/alta (1/10 mg/kg) no producen alteraciones de los reflejos sensoriales, motores y de coordinación sensorio-motora.
2. La administración aguda de PEA a dosis intermedia/alta no interfiere en el patrón exploratorio normal, ni producen cambios emocionales de tipo ansiolítico/ansiogénico; aunque la dosis más alta testada (10 mg/kg) sí induce una reducción significativa de la locomoción horizontal y de la conducta espontánea en los animales tratados.
3. La administración repetida de PEA a dosis intermedia/alta bloquea la adquisición de la LC y de la SC inducida por cocaína.
4. La administración aguda de la dosis alta de PEA reduce la expresión de la LC, mientras que tanto la dosis intermedia como la alta bloquean la expresión de la SC inducida por cocaína.
5. La administración repetida de PEA no interfiere en la adquisición del CLP inducido por cocaína, observándose un ligero incremento en el grupo pre-tratado con PEA 10 mg/kg respecto al resto. Además, la dosis alta de PEA induce un aumento significativo de la LC el día del test.
6. La administración aguda de PEA a ambas dosis bloquea la expresión de la respuesta de CLP y, además, la dosis alta es capaz de anular la expresión de la LC inducida por cocaína.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA

- Adès, J. y Lejoyeux, M. (2003). *Las nuevas adicciones: internet, sexo, juego, deportes, compras, trabajo, dinero*. Barcelona: Kairós.
- Aguilar, M. A, Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Reviews*, 59(2), 253–277. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.08.002
- Ahmed, S. H. y Koob, F. (1998). Transition from Moderate to Excessive Drug Intake: Change in Hedonic Set Point. *Science*, 282(5387), 298–300. doi:10.1126/science.282.5387.298
- Ahmed, S. H. y Koob, G. F. (1997). Cocaine-but not food-seeking behavior is reinstated by stress after extinction. *Psychopharmacology*, 132(3), 289–295. doi:10.1007/s002130050347
- Ambroggi, F., Ghazizadeh, A., Nicola, S. M. y Fields, H. L. (2011). Roles of nucleus accumbens core and shell in incentive-cue responding and behavioral inhibition. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(18), 6820–6830. doi:10.1523/JNEUROSCI.6491-10.2011
- American Psychiatric Association. (2002). *DSM-IV-TR Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition TR*. Masson.
- American Psychiatric Association. (2013). *DSM-V. American Journal of Psychiatry*. doi:10.1176/appi.books.9780890425596.744053
- Antón, M., Alén, F., Gómez de Heras, R., Serrano, A., Pavón, F. J., Leza, J. C. et al. (2016). Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addiction Biology*, (March), 1-18. doi:10.1111/adb.12365
- Araos, P., Vergara-Moragues, E., Pedraz, M., Pavón, F., J., Campos Cloute, R., Calado, M. et al. (2014). Psychopathological comorbidity in cocaine users in outpatient treatment. *Adicciones*, 26(1), 15–26. Recuperado de <http://www.adicciones.es/index.php/adicciones/article/view/124/120>
- Aston-jones, G., Smith, R. J., Sartor, G. C., Moorman, D. E., Massi, L., Tahsili-fahadan, P., y Richardson, K. A. (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Research*, 1314, 74–90. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.106.
- Badiani, a. y Robinson, T. E. (2004). Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behavioural Pharmacology*, 15(5), 327–339. doi:10.1097/00008877-200409000-00004



- Badiani, A. (2013). Substance-specific environmental influences on drug use and drug preference in animals and humans. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 588–596. doi:10.1016/j.conb.2013.03.010
- Bagdas, D., Muldoon, P. P., AlSharari, S., Carroll, F. I., Negus, S. S. y Damaj, M. I. (2016). Expression and pharmacological modulation of visceral pain-induced conditioned place aversion in mice. *Neuropharmacology*, 102, 236–243. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.024
- Baker, D. A, McFarland, K., Lake, R. W., Shen, H., Tang, X. C., Toda, S. y Kalivas, P. W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nature Neuroscience*, 6(7), 743–749. doi:10.1038/nn1069
- Ballesteros-Yáñez, I., Valverde, O., Ledent, C., Maldonado, R. y DeFelipe, J. (2007). Chronic cocaine treatment alters dendritic arborization in the adult motor cortex through a CB1 cannabinoid receptor-dependent mechanism. *Neuroscience*, 146(4), 1536–1545. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.03.017
- Balster, R. L. (1991). Drug abuse potential evaluation in animals. *British Journal of Addiction*, 86(12), 1549–1558. doi: 10.1111/j.1360-0443.1991.tb01747.x
- Bandoh, K., Y, J. A., Taira, A., Tsujimoto, M. y Arai, H. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Letters*, 478, 159–165. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01827-5
- Barak Caine, S., Heinrichs, S. C., Coffin, V. L. y Koob, G. F. (1995). Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Research*, 692(1-2), 47–56. doi:10.1016/0006-8993(95)00598-K
- Bardo, M. T. y Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153(1), 31–43. doi:10.1007/s002130000569
- Barr, J. L., Forster, G. L. y Unterwald, E. M. (2014). Adaptation of the hippocampus-accumbens pathway following repeated cocaine. *Drug and Alcohol Dependence*, 140(2014), e11. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.02.051
- Becerra-García, A. (2007). Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y maladaptaciones. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 39(1), 75–81. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rlps/v39n1/v39n1a06>
- Bechara, A., Dolan, S., Denburg, N., Hindes, A., Anderson, S. W. y Nathan, P. E. (2001). Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. *Neuropsychologia*, 39(4), 376–389. doi:10.1016/S0028-3932(00)00136-6

- Berridge, K. C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, *191*(3), 391–431. doi:10.1007/s00213-006-0578-x
- Besheer, J., Grondin, J., Cannady, R., Sharko, A., Faccidomo, S. y Hodge, C. (2010). Metabotropic Glutamate Receptor 5 activity in the Nucleus Accumbens is required for the maintenance of ethanol self-administration in a rat genetic model of high alcohol intake. *Biological Psychiatry*, *67*(9), 812–822. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.016.
- Bilbao, A., Blanco, E., Luque-Rojas, M. J., Suárez, J., Palomino, A., Vida, M., ... Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPAR α receptor-independent mechanism. *Addiction Biology*, *18*(1), 78–87. doi:10.1111/adb.12006
- Bilbao, A., Serrano, A., Cippitelli, A., Pavón, F. J., Giuffrida, A., Suárez, J. et al. (2015). Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addiction Biology*, 1–14. doi:10.1111/adb.12276
- Björklund, A., Dunnett, S. ., Stenevi, U., Lewis, M. y Iversen, S. . (1980). Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Research*, *199*(2), 307–333. doi: 10.1016/0006-8993(80)90692-7
- Borgland, S. L., Ungless, M. A. y Bonci, A. (2010). Convergent actions of orexin/hypocretin and CRF on dopamine neurons: Emerging players in addiction. *Brain Research*, *1314*, 139–144. doi:10.1016/j.brainres.2009.10.068
- Borrelli, F., Romano, B., Petrosino, S., Pagano, E., Capasso, R., Coppola, D. et al. (2015). Palmitoylethanolamide, a naturally occurring lipid, is an orally effective intestinal anti-inflammatory agent. *British Journal of Pharmacology*, *172*(1), 142–158. doi:10.1111/bph.12907
- Bouaboula, M., Hilairet, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G. y Casellas, P. (2005). Anandamide induced PPAR γ transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *European Journal of Pharmacology*, *517*(3), 174–181. doi:10.1016/j.ejphar.2005.05.032
- Bouton, M. E. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian. *Psychological Bulletin*, *114*(1), 80–99. doi: 10.1037/0033-2909.114.1.80
- Bouton, M. E. y Swartzentruber, D. (1991). Sources of relapse after extinction in Pavlovian and instrumental learning. *Clinical Psychology Review*, *11*(2), 123–140. doi:10.1016/0272-7358(91)90091-8
- Braida, D., Virag, W., Ottonello, F., Inghilterra, S., Gori, E. y Sala, M. (1998). A novel method for self-administering addicting drugs intracerebroventricularly in a free-choice procedure. *Brain Research Protocols*, *3*(2), 135–141. doi: 10.1016/S1385-299X(98)00034-8

- Breiter, H. C., Gollub, R. L., Weisskoff, R. M., Kennedy, D. N., Makris, N., Berke, J. D. et al. (1997). Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron*, 19(3), 591–611. doi:10.1016/S0896-6273(00)80374-8
- Brenhouse, H. C., Montalto, S. y Stellar, J. R. (2006). Electrolytic lesions of a discrete area within the nucleus accumbens shell attenuate the long-term expression, but not early phase, of sensitization to cocaine. *Behavioural Brain Research*, 170(2), 219–223. doi:10.1016/j.bbr.2006.02.029
- Bruijnzeel, A. W., Qi, X., Guzhva, L. V., Wall, S., Deng, J. V., Gold, M. S. et al. (2016). Behavioral characterization of the effects of cannabis smoke and anandamide in rats. *Plos One*, 11(4), e0153327. doi:10.1371/journal.pone.0153327
- Bystrowska, B., Smaga, I., Frankowska, M. y Filip, M. (2014). Changes in endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain structures following cocaine self-administration and extinction training. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 50, 1–10. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.12.002
- Caballero, L. (2005). *Adicción a cocaína: Neurobiología, clínica, diagnóstico y tratamiento*. Madrid: Secretaría General de sanidad. Delegación del gobierno para el Plan General Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L. y Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and CAMP. *The Journal of Neuroscience*, 16(12), 3934–3942. Recuperado de <http://www.jneurosci.org/content/16/12/3934.long>
- Calignano, A., Rana, G. La, Giuffrida, A. y Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 394(July), 277–281. Recuperado de <http://www.nature.com/nature/journal/v394/n6690/abs/394277a0.html>
- Camí, J. y Farré, M. (2003). Drug Addiction, 975–987. doi: 10.1056/NEJMra023160
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Cuomo, V., Astarita, G., Fu, J. y Piomelli, D. (2009). Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 8027–8031. doi: 10.1073/pnas.0903038106
- Carboni, E. y Vacca, C. (2003). Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. *Methods in Molecular Medicine*, 79, 481–498. Recuperado de <http://link.springer.com/protocol/10.1385%2F1-59259-358-5%3A481>
- Carey, a N., Borozny, K., Aldrich, J. V. y McLaughlin, J. P. (2007). Reinstatement of cocaine place-conditioning prevented by the peptide kappa-opioid receptor antagonist arodyn. *European Journal of Pharmacology*, 569(1-2), 84–89. doi:10.1016/j.ejphar.2007.05.007



- Carlsson, A., Lindqvist, M. y Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, *180*, 1200. doi: 10.1038/1801200a0
- Carobrez, A. P. y Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(8), 1193–1205. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.04.017
- Carter, B. L. y Tiffany, S. T. (1999). Meta-analysis of cue-reactivity in addiction research. *Addiction*, *94*(3), 327–340. doi:10.1046/j.1360-0443.1999.9433273.x
- Castilla-Ortega, E., Blanco, E., Serrano, A., Ladrón de Guevara-Miranda, D., Pedraz, M., Estivill-Torrús, G. et al. (2015). Pharmacological reduction of adult hippocampal neurogenesis modifies functional brain circuits in mice exposed to a cocaine conditioned place preference paradigm. *Addiction Biology*, 1–14. doi:10.1111/adb.12248
- Castilla-Ortega, E., Serrano, A., Blanco, E., Araos, P., Suárez, J., Pavón, F. et al. (2016). A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: potential roles for adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.03.030
- Chaperon, F., Soubrié, P., Puech, A. J. y Thiébot, M. H. (1998). Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology*, *135*(4), 324–332. doi:10.1007/s002130050518
- Chauvet, C., Lardeux, V., Goldberg, S., Jaber, M. y Solinas, M. (2009). Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacology*, *34*(13), 2767–2778. doi:10.1038/npp.2009.127.
- Cheer, J. F., Kendall, D. y Marsden, C. (2000). Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. *Psychopharmacology*, *151*(1), 25–30. doi:10.1007/s002130000481
- Childress, A. R., Mozley, P., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M. y O'Brien, C. P. (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *American Journal of Psychiatry*, *156*(1), 11–18. doi: 10.1176/ajp.156.1.11
- Cleva, R. M. y Gass, J. T. (2010). Neuroanatomical Structures Underlying the Extinction of drug-seeking behavior. *The Open Addiction Journal*, *3*, 63–75. doi:10.2174/1874941001003020063
- Colombo, G., Vacca, G., Serra, S., Carai, M. a M. y Gessa, G. L. (2004). Suppressing effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on alcohol's motivational properties in alcohol-preferring rats. *European Journal of Pharmacology*, *498*(1-3), 119–123. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.069
- Conrad, K. L., Tseng, K. Y., Uejima, J. L., Reimers, J. M., Heng, L., Shaham, Y. et al. (2008). Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates

- incubation of cocaine craving. *Nature*, 454(7200), 118–121. doi:10.1038/nature06995.
- Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D. y Giagnoni, G. (2002). Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), 181–188. doi: 10.1038/sj.bjp.0704466
- Coppola, M. y Mondola, R. (2014). Is there a role for palmitoylethanolamide in the treatment of depression?. *Medical Hypotheses*, 82(5), 507–511. doi:10.1016/j.mehy.2013.12.016
- Corominas, M., Roncero, C., Ribases, M., Castells, X. y Casas, M. (2007). Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology*, 55(1), 2–13. doi:10.1159/000103570
- Costa, B., Comelli, F., Bettoni, I., Colleoni, M. y Giagnoni, G. (2008). The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*, 139(3), 541–150. doi:10.1016/j.pain.2008.06.003
- Crespo-Fernández, J. A. y Armida, C. (2007). Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 83–107. Recuperado de http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?pid=S0120-05342007000100008&script=sci_arttext
- Crupi, R., Paterniti, I., Ahmad, A., Campolo, M., Esposito, E. y Cuzzocrea, S. (2013). Effects of palmitoylethanolamide and luteolin in an animal model of anxiety/depression. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 12(7), 989–1001. doi:10.2174/18715273113129990084
- De Lago, E., de Miguel, R., Lastres-Becker, I., Ramos, J. A. y Fernández-Ruiz, J. (2004). Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence. *Brain Research*, 1007(1-2), 152–159. doi:10.1016/j.brainres.2004.02.016
- De Vries, T. J., Schoffelmeer, A. N. M., Binnekade, R., Mulder, A. H. y Vanderschuren, L. J. M. J. (1998). Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine- seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *European Journal of Neuroscience*, 10(11), 3565–3571. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00368.x
- De Vries, T., Shaham, Y. y Homberg, J. (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nature Medicine*, 7(10), 1151–1154. Recuperado de <http://www.nature.com/nm/journal/v7/n10/abs/nm1001-1151.html>

- Degenhardt, L. y Hall, W. (2012). Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. *Lancet*, 379(9810), 55–70. doi:10.1016/S0140-6736(11)61138-0
- Deroche-Gamonet, V. y Piat, F. (2002). Influence of cue-conditioning on acquisition, maintenance and relapse of cocaine intravenous self-administration. *European Journal of Neuroscience*, 15(8), 1363–1370. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1460-9568.2002.01974.x/full>
- Di Chiara, G. y Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(July), 5274–5278. Recuperado de <http://www.pnas.org/content/85/14/5274.short>
- Di Ciano, P., Gouty, A., Depoortero, R. Y., Egilmez, Y., Lane, J. D., Emmett-Oglesby, M. W. et al. (1995). Comparison of changes in extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens during intravenous self-administration of cocaine or d-amphetamine. *Behavioural Pharmacology*, 6(4), 311-322. doi:10.1097/00008877-199506000-00002
- Di Marzo, V., Lastres-Becker, I., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Milone, A., Davis, J. B. y Fernandez-Ruiz, J. J. (2001). Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *European Journal of Pharmacology*, 420(2-3), 123–131. doi:10.1016/S0014-2999(01)01012-3
- Domjan, M. (2003). *Principios de aprendizaje y conducta*. (Quinta Edi.). Madrid: Thomson.
- Esposito, E., Impellizzeri, D., Mazzon, E., Paterniti, I. y Cuzzocrea, S. (2012). Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PloS One*, 7(8), 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0041880
- Ettenberg, A. (2004). Opponent process properties of self-administered cocaine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(8), 721–728. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.009
- Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W. y Robbins, T. W. (2008). Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1507), 3125–3135. doi:10.1098/rstb.2008.0089
- Everitt, B. J. y Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481–1489. doi:10.1038/nn1579
- Fattore, L., Martellotta, M. C., Cossu, G., Mascia, M. S. y Fratta, W. (1999). CB 1 cannabinoid receptor agonist WIN 55 , 212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 104, 141–146. doi:10.1016/S0166-4328(99)00059-5

- Feltenstein, M. W. y See, R. E. (2008). The neurocircuitry of addiction: an overview. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 261–274. doi:10.1038/bjp.2008.51
- Fernández-Espejo, E. (2006). Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Revista de Neurología*, 43(3), 147–154. Recuperado de <http://www.neurologia.com/pdf/Web/4303/w030147.pdf>
- Fernandez-Espejo, E., Ramiro-Fuentes, S. y Rodriguez de Fonseca, F. (2009). The absence of a functional peroxisome proliferator-activated receptor- α gene in mice enhances motor sensitizing effects of morphine, but not cocaine. *Neuroscience*, 164(2), 667–675. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.023
- File, S. E. y Wardill, A. G. (1975). The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia*, 44(1), 47–51.
- Floresco, S. B., Todd, C. L. y Grace, A. A. (2001). Glutamatergic afferents from the Hippocampus to the Nucleus Accumbens regulate activity of Ventral Tegmental Area dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4915–4922. Recuperado de <http://www.jneurosci.org/content/21/13/4915/tab-article-info>
- Fortin, N. J., Agster, K. L. y Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nature Neuroscience*, 5(5), 458–462. doi:10.1038/nm834
- Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J., Kenny, P. J. y Neuroscience, M. (2011). Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor signaling controls nicotine intake. *Nature*, 471, 597–601. doi:10.1038/nature09797.Habenular
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez, D. F. et al. (2003). Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature*, 425(6953), 90–93. doi:10.1038/nature01921
- Fuchs, R. a, Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H. y See, R. E. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(2), 296–309. doi:10.1038/sj.npp.1300579
- Fuchs, R. a, Evans, K. A., Parker, M. C. y See, R. E. (2004). Differential involvement of the core and shell subregions of the nucleus accumbens in conditioned cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology*, 176, 459–465. doi:10.1007/s00213-004-1895-6
- Galaj, E., Haynes, J., Nisanov, R., Ananthan, S. y Ranaldi, R. (2016). The dopamine D3 receptor antagonist, SR 21502, facilitates extinction of cocaine conditioned place preference. *Drug and Alcohol Dependence*, 159, 263–266. doi:10.1016/j.drugalcdep.2015.11.030

- García-fernández, G., García-rodríguez, O., Secades-villa, R., Sánchez-hervás, E. y Ramón, J. (2012). Psicopatología y funciones ejecutivas en adictos a la cocaína. *Anales de Psicología*, 28, 720–727. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=16723774009>
- Gatti, A., Lazzari, M., Gianfelice, V., Paolo, A. Di, Sabato, E. y Sabato, A. F. (2012). Palmitoylethanolamide in the treatment of chronic pain caused by different etiopathogenesis. *Pain Medicine*, 13, 1121–1130. doi: 10.1111/j.1526-4637.2012.01432.x
- Glaser, S. T. y Kaczocha, M. (2009). Temporal changes in mouse brain fatty acid amide hydrolase activity. *Neuroscience*, 163(2), 594–600. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.06.043
- Gobierno de España. Ministerio de sanidad asuntos sociales e igualdad. (2015). *Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías. ESTADÍSTICAS 2015. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España.*
- Gobira, P. y Moreira, F. (2015). Blockade of CB1 cannabinoid receptors and activation of CB2 interact to prevent cocaine-responses. *European Neuropsychopharmacology*, 25, S263–S264. doi:10.1016/S0924-977X(15)30303-5
- Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A. y Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(3-4), 105–111. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001
- Goldstein, A. (2001). *Addiction: from biology to drug policy* (2^a ed.). New York: Oxford University Press.
- Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X. y Narula, S. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Molecular Pharmacology*, 1045–1050. Recuperado de <http://molpharm.aspetjournals.org/content/57/5/1045.short>
- Goodman, A. (2008). Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochemical Pharmacology*, 75(1), 266–322. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.030
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. y Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260–265. doi: 10.1038/6365
- Grant, S. (2000). Drug abusers show impaired performance in a laboratory test of decision making. *Neuropsychologia*, 38(8), 1180–1187. doi:10.1016/S0028-3932(99)00158-X
- Griffiths, M. D. (2008). The biopsychosocial and “complex” systems approach as a unified framework for addiction. *Behavioral and Brain Sciences*, 31, 446–447. doi: 10.1017/S0140525X08004822



- Grimm, J. W., Hope, B. T., Wise, R. A. y Shaham, Y. (2001). Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*, 412(6843), 141–142. doi:10.1038/35084134.Incubation
- Guan, X., Wan, R., Zhu, C. y Li, S. (2014). Corticotropin-releasing factor receptor type-2 is involved in the cocaine-primed reinstatement of cocaine conditioned place preference in rats. *Behavioural Brain Research*, 258, 90–96. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.019
- Guida, F., Luongo, L., Marmo, F., Romano, R., Iannotta, M., Napolitano, F. et al. (2015). Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice. *Molecular Brain*, 8, 1-15. doi:10.1186/s13041-015-0139-5
- Guillazo-Blanch, G., Redolar-Ripoll, D., Soriano-Mas, C., Torras-García, M. y Vale-Martínez, A. (2007). *Fundamentos de Neurociencia*. UOC.
- Guzmán, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C. y Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *The Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 27849–27854. doi:10.1074/jbc.M404087200
- Hall, C. (1936). Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*, 22(3), 345–352.
- Haney, M. y Spealman, R. (2009). Controversies in translational research: Drug self-administration. *Psychopharmacology*, 199(3), 403–419. doi:10.1007/s00213-008-1079-x.Controversies
- Hansen, H. S. (2010). Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Experimental Neurology*, 224(1), 48–55. doi:10.1016/j.expneurol.2010.03.022
- Harkany, T., Mackie, K. y Doherty, P. (2008). Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(3), 338–345. doi:10.1016/j.conb.2008.08.007
- Harris, A. C., Pentel, P. R. y Lesage, M. G. (2007). Prevalence, magnitude, and correlates of an extinction burst in drug-seeking behavior in rats trained to self-administer nicotine during unlimited access (23 h/day) sessions. *Psychopharmacology*, 194(3), 395–402. doi:10.1007/s00213-007-0848-2
- Herbert, M. S., Der-ghazarian, T., Palmer, A. G. y Mcdougall, S. A. (2010). One-trial cocaine-induced behavioral sensitization in preweanling rats : role of contextual stimuli. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 18(3), 284–295. doi:10.1037/a0019142.One-Trial
- Hernández-Rabaza, V., Hontecillas-Prieto, L., Velázquez-Sánchez, C., Ferragud, A., Pérez-Villaba, A., Arcusa, A. et al. (2008). The hippocampal dentate gyrus is

essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 553–559. doi:10.1016/j.nlm.2008.06.008

- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature Neuroscience*, 11(7), 503–513. doi:10.1038/nrn2866.
- Ho, W.S. V, Barrett, D. A. y Randall, M. D. (2008). “Entourage” effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 155(6), 837–846. doi:10.1038/bjp.2008.324
- Hodos, W. y Kalman, G. (1963). Effects of increment size and reinforce volume on progressive-ratio performance. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 6, 387–392.
- Holland, P. C. y Bouton, M. E. (1999). Hippocampus and context in classical conditioning. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(2), 195–202. doi:10.1016/S0959-4388(99)80027-0
- Honey, R. C., Marshall, V. J., McGregor, a, Futter, J. y Good, M. (2007). Revisiting places passed: sensitization of exploratory activity in rats with hippocampal lesions. *Quarterly Journal of Experimental Psychology (2006)*, 60(5), 625–634. doi:10.1080/17470210601155252
- Hotsenpiller, G. y Wolf, M. (2002). Conditioned locomotion is not correlated with behavioral sensitization to cocaine: an intra-laboratory multi-sample analysis. *Neuropsychopharmacology*, 27(6), 924–929. Recuperado de <http://www.nature.com/npp/journal/v27/n6/abs/1395960a.html>
- Hu, S. S.-J., Liu, Y.-W. y Yu, L. (2015). Medial prefrontal cannabinoid CB1 receptors modulate consolidation and extinction of cocaine-associated memory in mice. *Psychopharmacology*, 232(10), 1803–1815. doi:10.1007/s00213-014-3812-y
- Hubner, C. B. y Koob, G. F. (1990). The ventral pallidum plays a role in mediating cocaine and heroin self-administration in the rat. *Brain Research*, 508(1), 20–29. doi: 10.1016/0006-8993(90)91112-T
- Huston, J. P., Silva, M. a. D. S., Topic, B. y Müller, C. P. (2013). What’s conditioned in conditioned place preference? *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(3), 162–166. doi:10.1016/j.tips.2013.01.004
- Ito, R., Dalley, J. W., Robbins, T. W. y Everitt, B. J. (2002). Dopamine release in the Dorsal Striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *The Journal of Neuroscience*, 22(14), 6247–6253.
- Ito, R., Robbins, T. W. y Everitt, B. J. (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by Nucleus Accumbens core and shell. *Nature Neuroscience*, 7(4), 389–397. doi:10.1038/nn1217

- Jolkkonen, E. S. A. y Pitka, A. (1998). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex : projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 395(January), 53–72. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980525)395:1<53::AID-CNE5>3.0.CO;2-G
- Kalivas, P. W. (2004). Glutamate systems in cocaine addiction. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(1), 23–29. doi:10.1016/j.coph.2003.11.002
- Kalivas, P. W. y Duffy, P. (1998). Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neurochemistry*, 70(4), 1497–1502. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70041497.x
- Kalivas, P. W. y 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
- Kalivas, P. W., Volkow, N. y Seamans, J. (2005). Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron*, 45(5), 647–650. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.005
- Katz, R. J. y Gormezano, G. (1979). A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 11(2), 231–233. doi:10.1016/0091-3057(79)90019-4
- Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(8), 765–776. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.015
- Kim, M., Kim, W., Baik, J.H. y Yoon, B.J. (2013). Different locomotor sensitization responses to repeated cocaine injections are associated with differential phosphorylation of GluA1 in the dorsomedial striatum of adult rats. *Behavioural Brain Research*, 257, 71–76. doi:10.1016/j.bbr.2013.09.038
- Koob, G. F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*, 59(1), 11–34. doi:10.1016/j.neuron.2008.06.012
- Koob, G. F. (2013). Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 559–563. doi:10.1016/j.conb.2013.03.011
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. a, Kenny, P. J., Markou, A. et al. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(8), 739–749. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.007
- Koob, G. y Le Moal, M. (2006). *Neurobiology of addiction*. Fribourg: Elsevier Academic.
- Koob, G. y Volkow, N. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35, 217–238. doi: 10.1038/npp.2009.110

- Lê, A., Lo, S., Harding, S., Juzytsch, W., Marinelli, P. W. y Funk, D. (2010). Co-administration of intravenous nicotine and oral alcohol in rats. *Psychopharmacology*, 208(3), 475–486. doi:10.1007/s00213-009-1746-6.Co-administration
- Le, A., Quan, B., Juzytsch, W. y Fletcher, P. (1998). Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology*, 135, 169–174. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/s002130050498>
- Leussis, M. P. y Bolivar, V. J. (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(7), 1045–1064. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.03.006
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q. et al. (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36), 13345–13350. doi:10.1073/pnas.0601832103
- Lizasoain, I., Moro, M. y Lorenzo, P. (2002). Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 14, 57–64. Recuperado de <http://www.adicciones.es/index.php/adicciones/article/view/513>
- Lo Verme, J., Gaetani, S., Fu, J., Oveisi, F., Burton, K. y Piomelli, D. (2005). Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(6), 708–716. doi:10.1007/s00018-004-4494-0
- Lo Verme, J., Russo, R., La Rana, G., Fu, J., Farthing, J., Mattace-Raso, G. y Piomelli, D. (2006). Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1051–1061. doi:10.1124/jpet.106.111385.morphine
- Lombardi, G., Miglio, G. y Varsaldi, F. (2007). Oxyhomologation of the amide bond potentiates neuroprotective effects of the endolipid N-palmitoylethanolamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(2), 599–606. doi:10.1124/jpet.106.112987
- Loría, F., Petrosino, S., Mestre, L., Spagnolo, A., Correa, F., Hernangómez, M. et al. (2008). Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *The European Journal of Neuroscience*, 28(4), 633–641. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06377.x
- Lu, L., Grimm, J. W., Hope, B. T. y Shaham, Y. (2004). Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of preclinical data. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 214–226. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.027
- Lu, L., Liu, D. y Ceng, X. (2001). Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates stress-induced relapse to cocaine-conditioned place preference in rats.

European Journal of Pharmacology, 415(2-3), 203–208. doi:10.1016/S0014-2999(01)00840-8

- Lu, L., Zhang, B., Liu, Z. y Zhang, Z. (2002). Reactivation of cocaine conditioned place preference induced by stress is reversed by cholecystokinin-B receptors antagonist in rats. *Brain Research*, 954, 132–140. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899302033590>
- Luchicchi, A., Lecca, S., Carta, S., Pillolla, G., Muntoni, A. L., Yasar, S. et al. (2010). Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR-alpha nuclear receptors. *Addiction Biology*, 15(3), 277–288. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00222.x
- Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R. y Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*, 333, 353–357. doi: 10.1126/science.1204622
- Maldonado, C., Rodríguez-Arias, M., Castillo, a, Aguilar, M. A. y Miñarro, J. (2007). Effect of memantine and CNQX in the acquisition, expression and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(4), 932–939. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.02.012
- Malleret, G., Hen, R., Guillou, J., Segu, L. y Buhot, M. (1999). 5-HT1B receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *The Journal of Neuroscience*, 19(14), 6157–6168. Recuperado de <http://www.jneurosci.org/content/19/14/6157.short>
- Malvaez, M., Sanchis-Segura, C., Vo, D., Lattal, K. M. y Wood, M. a. (2010). Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biological Psychiatry*, 67(1), 36–43. doi:10.1016/j.biopsych.2009.07.032
- Marshall, F. y Teitelbaum, P. (1974). Further analysis of sensory inattention following lateral hypothalamic damage in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86, 375–395.
- Mascia, P., Pistis, M., Justinova, Z., Panlilio, L. V, Luchicchi, A., Lecca, S. et al. (2011). Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biological Psychiatry*, 69(7), 633–641. doi:10.1016/j.biopsych.2010.07.009
- Mattingly, B., Hart, T., Lim, K. y Perkins, C. (1994). Selective antagonism of dopamine D1 and D2 receptors does not block the development of behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacology*, 114(2), 239–242. doi: 10.1007/BF02244843
- Mattson, B. J., Koya, E., Simmons, D. E., Mitchell, T. B., Berkow, A., Crombag, H. S. y Hope, B. T. (2008). Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *The*

European Journal of Neuroscience, 27(1), 202–212. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05984.x

- Mazzola, C., Medalie, J., Scherma, M., Panlilio, L. V, Solinas, M., Tanda, G. et al. (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(5), 332–337. doi:10.1101/lm.1145209
- McDougall, S. a, Baella, S. a, Stuebner, N. M., Halladay, L. R. y Crawford, C. A. (2007). Cocaine-induced behavioral sensitization in preweanling and adult rats: effects of a single drug-environment pairing. *Psychopharmacology*, 193(3), 323–332. doi:10.1007/s00213-007-0788-x
- McDougall, S. a, Cortez, A. M., Palmer, A. G., Herbert, M. S., Martinez, C. E., Charntikov, S. y Amodeo, D. a. (2009). Importance of environmental context for one- and three-trial cocaine-induced behavioral sensitization in preweanling rats. *Psychopharmacology*, 206(3), 377–388. doi:10.1007/s00213-009-1616-2
- McDougall, S. a, Kozanian, O. O., Greenfield, V. Y., Horn, L. R., Gutierrez, A., Mohd-Yusof, A. y Castellanos, K. a. (2011). One-trial behavioral sensitization in preweanling rats: differential effects of cocaine, methamphetamine, methylphenidate, and D-amphetamine. *Psychopharmacology*, 217(4), 559–571. doi:10.1007/s00213-011-2316-2
- McFarland, K., Davidge, S. B., Lapish, C. C. y Kalivas, P. W. (2004). Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(7), 1551–1560. doi:10.1523/JNEUROSCI.4177-03.2004
- McFarland, K., Lapish, C. C. y Kalivas, P. W. (2003). Prefrontal Glutamate release into the core of the Nucleus Accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *Journal of Neuroscience*, 23(8), 3531–3537. Recuperado de <http://jneurosci.org/content/23/8/3531>
- McGinty, V., Hayden, B., Heilbronner, S., Dumont, E., Graves, S., Mirrione, M. et al. (2011). Emerging, reemerging, and forgotten brain areas of the reward circuit: notes from the 2010 motivational and neural networks conference. *Behavioural Brain Research*, 225(1), 348–357. doi:10.1016/j.bbr.2011.07.036
- McGregor, I., Issakidis, C. y Prior, G. (1996). Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53(3), 657–664. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305795020667>
- McLaughlin, J. y See, R. E. (2003). Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 168(1-2), 57–65. doi:10.1007/s00213-002-1196-x

- Melis, M., Pillolla, G., Luchicchi, A., Muntoni, A. L., Yasar, S., Goldberg, S. R. y Pistis, M. (2008). Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(51), 13985–13994. doi:10.1523/JNEUROSCI.3221-08.2008
- Mena, G., Giraudon, I., Álvarez, E., Corkery, J. M., Matias, J., Grasaasen, K. et al. (2013). Cocaine-related health emergencies in Europe: A review of sources of information, trends and implications for service development. *European Addiction Research*, 19(2), 74–81. doi:10.1159/000341719
- Meyers, R. a, Zavala, A. R. y Neisewander, J. L. (2003). Dorsal, but not ventral, hippocampal lesions disrupt cocaine place conditioning. *Neuroreport*, 14(16), 2127–2131. doi:10.1097/01.wnr.0000095709.83808.81
- Meyers, R. a, Zavala, A. R., Speer, C. M. y Neisewander, J. L. (2006). Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference. *Behavioral Neuroscience*, 120(2), 401–412. doi:10.1037/0735-7044.120.2.401
- Mezey, E., Toth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R. et al. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3655–3660. doi:10.1073/pnas.97.7.3655
- Milton, A. L. y Everitt, B. J. (2010). The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction. *The European Journal of Neuroscience*, 31(12), 2308–2319. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07249.x
- Milton, A. L. y Everitt, B. J. (2012a). Neuroscience. Wiping drug memories. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6078), 167–168. doi:10.1126/science.1221691
- Milton, A. L. y Everitt, B. J. (2012b). The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(4), 1119–1139. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.01.002
- Mogenson, G., Jones, D. y Yim, C. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 14, 69–97. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0301008280900180>
- Moran, M. M., McFarland, K., Melendez, R. I., Kalivas, P. W. y Seamans, J. K. (2005). Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(27), 6389–6393. doi:10.1523/JNEUROSCI.1007-05.2005

- Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S. y Cerù, M. . (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, *123*(1), 131–145. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.08.064
- Morgan, D., Grant, K. A, Gage, H. D., Mach, R. H., Kaplan, J. R., Prioleau, O. et al. (2002). Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nature Neuroscience*, *5*(2), 169–174. doi:10.1038/nn798
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. y O’Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*(5868), 681–683. doi: 10.1038/297681a0
- Muccioli, G. G. (2010). Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discovery Today*, *15*(11-12), 474–83. doi:10.1016/j.drudis.2010.03.007
- Murillo-Rodríguez, E., Désarnaud, F. y Prospéro-García, O. (2006). Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sciences*, *79*(1), 30–7. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.028
- Murray, J. E., Dilleen, R., Pelloux, Y., Economidou, D., Dalley, J. W., Belin, D. y Everitt, B. J. (2014). Increased impulsivity retards the transition to dorsolateral striatal dopamine control of cocaine seeking. *Biological Psychiatry*, *76*(1), 15–22. doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.011
- Myers, K. M. y Carlezon, W. A. (2010). Extinction of drug- and withdrawal-paired cues in animal models: relevance to the treatment of addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(2), 285–302. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.01.011
- Naqvi, N. . y Bechara, A. (2009). The hidden island of addiction: the insula. *Trends Neuroscience*, *32*(1), 56–67. doi:10.1016/j.tins.2008.09.009
- Naqvi, N. y Bechara, A. (2010). The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. *Brain Structure Functions*, *214*(0), 435–450. doi:10.1007/s00429-010-0268-7
- Nazarian, A., Russo, S. J., Festa, E. D., Kraish, M. y Quinones-Jenab, V. (2004). The role of D1 and D2 receptors in the cocaine conditioned place preference of male and female rats. *Brain Research Bulletin*, *63*(4), 295–299. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.03.004
- Nestler, E. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(February), 119–128. Recuperado de http://www.nature.com/nrn/journal/v2/n2/abs/nrn0201_119a.html
- Nestler, E. J. (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(4), 210–218. doi:10.1016/j.tips.2004.02.005



- Nestler, E. J. (2013). Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15, 431–443. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898681/#!po=1.61290>
- Nestler, E. J., Terwilliger, R. Z., Walker, J. R., Sevarino, K. A. y Duman, R. S. (1990). Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits g_i alpha and g_o alpha in discrete regions of rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 55(3), 1079–1082. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04602.x
- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, (OEDT). (2014). *2014 Annual report on the state of the drugs problem in Europe*. Lisboa: European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction. [EMCDDA].
- Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T. y Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5298–5305. doi:10.1074/jbc.M306642200
- Olds, J. y Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419–427.
- Organización Mundial de la Salud. (1994). *CIE-10. Trastornos mentales y del comportamiento*. Madrid: Meditor.
- Orio, L., Edwards, S., George, O., Parsons, L. H. y Koob, G. F. (2009). A role for the endocannabinoid system in the increased motivation for cocaine in extended-access conditions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(15), 4846–4857. doi:10.1523/JNEUROSCI.0563-09.2009
- Otis, J. M., Fitzgerald, M. K. y Mueller, D. (2014). Inhibition of hippocampal β -adrenergic receptors impairs retrieval but not reconsolidation of cocaine-associated memory and prevents subsequent reinstatement. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(2), 303–310. doi:10.1038/npp.2013.187
- Paladini, A., Fusco, M., Cenacchi, T., Schievano, C., Piroli, A. y Varrassi, G. (2016). Palmitoylethanolamide, a special food for medical purposes, in the treatment of chronic pain: a pooled data meta-analysis. *Pain Physician*, 19, 11–24. Recuperado de <http://www.painphysicianjournal.com/current/pdf?article=MjUxMw%3D%3D>
- Panlilio, L. ., Mazzola, C., Drago, F., Medalie, J., Hahn, B., Tanda, G. y Goldberg, S. (2009). Anandamide-induced behavioral disruption through a vanilloid- dependent mechanism in rats. *Psychopharmacology*, 203(3), 529–538. doi:10.1007/s00213-008-1399-x
- Panlilio, L. V, Solinas, M., Matthews, S. A. y Goldberg, S. R. (2007). Previous exposure to THC alters the reinforcing efficacy and anxiety-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American*

- College of Neuropsychopharmacology*, 32(3), 646–657.
doi:10.1038/sj.npp.1301109
- Panlilio, L. V., Yasar, S., Nemeth-Coslett, R., Katz, J. L., Henningfield, J. E., Solinas, M. et al. (2005). Human cocaine-seeking behavior and its control by drug-associated stimuli in the laboratory. *Neuropsychopharmacology*, 30(2), 433–443. doi:10.1038/sj.npp.1300599
- Parikh, V., Naughton, S. X., Shi, X., Kelley, L. K., Yegla, B., Tallarida, C. S. et al. (2014). Cocaine-induced neuroadaptations in the dorsal striatum: glutamate dynamics and behavioral sensitization. *Neurochemistry International*, 75, 54–65. doi:10.1016/j.neuint.2014.05.016
- Parsons, L. H., Koob, G. F. y Weiss, F. (1995). Serotonin dysfunction in the Nucleus Accumbens of rats during withdrawal after unlimited access to intravenous cocaine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274(3), 1182–1191. Recuperado de <http://jpet.aspetjournals.org/content/274/3/1182>
- Pavlov, I. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford University Press, London.
- Pavón, F. J., Araos, P., Pastor, A., Calado, M., Pedraz, M., Campos-Cloute, R. et al. (2013). Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric comorbidity. *Addiction Biology*, 18(6), 955–969. doi:10.1111/adb.12107
- Pedraz, M., Araos, P., García-Marchena, N., Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J. et al. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Frontiers in Psychiatry*, 6(February), 1-14. doi:10.3389/fpsy.2015.00017
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. y Briley, M. (1985). Validation of open "closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Pellow, S. y File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(3), 525–529. doi:10.1016/0091-3057(86)90552-6
- Peters, J., LaLumiere, R. T. y Kalivas, P. W. (2008). Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(23), 6046–6053. doi:10.1523/JNEUROSCI.1045-08.2008
- Petrosino, S., Cristino, L., Karsak, M., Gaffal, E., Ueda, N., Tüting, T. et al. (2010). Protective role of palmitoylethanolamide in contact allergic dermatitis. *Allergy*, 65(6), 698–711. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02254.x
- Pierce, R. C., Born, B., Adams, M. y Kalivas, P. W. (1996). Repeated intra-ventral tegmental area administration of SKF-38393 induces behavioral and

- neurochemical sensitization to a subsequent cocaine challenge. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(1), 384–392. Recuperado de <http://jpet.aspetjournals.org/content/278/1/384>
- Pierce, R. C. y Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 25(2), 192–216. doi:10.1016/S0165-0173(97)00021-0
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(11), 873–884. doi:10.1038/nrn1247
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T. R. et al. (2006). Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews*, 12(1), 21–38. doi:10.1111/j.1527-3458.2006.00021.x
- Proulx, K., Cota, D., Castañeda, T. R., Tschöp, M. H., D'Alessio, D. a, Tso, P., ... y Seeley, R. J. (2005). Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(3), R729–R737. doi:10.1152/ajpregu.00029.2005
- Rahimi, a, Faizi, M., Talebi, F., Noorbakhsh, F., Kahrizi, F. y Naderi, N. (2015). Interaction between the protective effects of cannabidiol and palmitoylethanolamide in experimental model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice. *Neuroscience*, 290, 279–287. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.030
- Re, G., Barbero, R., Miolo, A. y Di Marzo, V. (2007). Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 173(1), 21–30. doi:10.1016/j.tvjl.2005.10.003
- Ritz, M., Lamb, R. J., Goldberg, S. R. y Kuhar, M. J. (1987). Cocaine receptor on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*, 237, 1219–1223. doi: 10.1126/science.2820058
- Robbins, T. W., Ersche, K. D. y Everitt, B. J. (2008). Drug addiction and the memory systems of the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141, 1–21. doi:10.1196/annals.1441.020
- Roberts, D. y Koob, G. (1982). Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 17, 901–904. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305782904695>
- Roberts, D., Koob, G., Klonoff, P. y Fibiger, H. (1980). Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12(5), 781–787. doi: 10.1016/0091-3057(80)90166-5

- Robinson, T. E. (2004). Addicted rats. *Science*, *305*, 951–953. doi: 10.1126/science.1102496
- Robinson, T. E. y Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *18*(3), 247–291. doi: 10.1016/0165-0173(93)90013-P
- Robinson, T. E. y Berridge, K. C. (2003). Addiction. *Annual Review of Psychology*, *54*, 25–53. doi:10.1146/annurev.psych.54.101601.145237
- Robinson, T., Gorny, G., Mitton, E. y Kolb, B. (2001). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse*, *39*, 257–266. Recuperado de <http://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/34991>
- Rodgers, R. J. y Dalvi, a. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *21*(6), 801–810. doi:10.1016/S0149-7634(96)00058-9
- Rodríguez Bambico, F., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G. y Gobbi, G. (2009). Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: Evidence from animal models. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(14), 1623–1646. doi:10.2174/138161209788168029
- Rodríguez de Fonseca, F., Carrera, M. ., Navarro, M., Koob, G. y Weiss, F. (1997). Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, *276*(5321), 2050–2054. doi: 10.1126/science.276.5321.2050
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A. y Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, *40*(1), 2–14. doi:10.1093/alcalc/agh110
- Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gómez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J. y Piomelli, D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, *414*(6860), 209–212. doi: 10.1038/35102582
- Rogers, J. L. y See, R. E. (2007). Selective inactivation of the ventral hippocampus attenuates cue-induced and cocaine-primed reinstatement of drug-seeking in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*(4), 688–692. doi:10.1016/j.nlm.2007.01.003
- Romero, J., Garcia, L., Cebeira, M., Zdrozny, D., Fernández-Ruiz, J. y Ramos, J. (1995). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sciences*, *56*(95), 2033–2040. doi: 0024-3205(95)00186-7



- Rudy, J. W., Barrientos, R. M. y O'Reilly, R. C. (2002). Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behavioral Neuroscience*, *116*(4), 530–538. doi:10.1037//0735-7044.116.4.530
- Ruiz Sánchez de León, J. M. y Pedrero-Pérez, E. J. (2014). *Neuropsicología de la Adicción*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Sanchez, C., Bailie, T., Wu, W.R., Li, N. y Sorg, B. (2003). Manipulation of dopamine d1-like receptor activation in the rat medial prefrontal cortex alters stress- and cocaine-induced reinstatement of conditioned place preference behavior. *Neuroscience*, *119*(2), 497–505. doi:10.1016/S0306-4522(03)00078-2
- Sánchez-Hervás, E. y Llorente del Pozo, J. M. (2012). Recaídas en la adicción a cocaína: una revisión. *Adicciones*, *24*, 269–280. Recuperado de <http://www.adicciones.es/index.php/adicciones/article/view/98>
- Santin, L. J., Bilbao, A., Pedraza, C., Matas-Rico, E., López-Barroso, D., Castilla-Ortega, E. et al. (2009). Behavioral phenotype of maLPA1-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes, Brain, and Behavior*, *8*(8), 772–784. doi:10.1111/j.1601-183X.2009.00524.x
- Sartor, G. y Aston-Jones, G. (2012). A septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons which is necessary for conditioned cocaine preference. *Journal of Neuroscience*, *32*(13), 4623–4631. doi:10.1523/JNEUROSCI.4561-11.2012.A
- Sartor, G. C., Powell, S. K., Wiedner, H. J., Wahlestedt, C. y Brothers, S. P. (2016). Nociceptin receptor activation does not alter acquisition, expression, extinction and reinstatement of conditioned cocaine preference in mice. *Brain Research*, *1632*, 34–41. doi:10.1016/j.brainres.2015.11.044
- Schenk, S. y Gittings, D. (2003). Effects of SCH 23390 and eticlopride on cocaine-seeking produced by cocaine and WIN 35,428 in rats. *Psychopharmacology*, *168*(1-2), 118–123. doi:10.1007/s00213-002-1276-y
- Scherma, M., Medalie, J., Fratta, W., Vadivel, S., Makriyannis, A., Piomelli, D. et al. (2008). The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition Maria. *Neuropharmacology*, *54*(1), 129–140. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.08.011
- Schoffelmeer, A. N. M., De Vries, T. J., Wardeh, G., Van de Ven, H. W. M. y Vanderschuren, L. J. M. J. (2002). Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation. *The Journal of Neuroscience*, *22*(8), 3269–3276. doi: 20026312
- Scuderi, C., Stecca, C., Valenza, M., Ratano, P., Bronzuoli, M. R., Bartoli, S. et al. (2014). Palmitoylethanolamide controls reactive gliosis and exerts neuroprotective functions in a rat model of Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease*, *5*(9), 1-12. doi:10.1038/cddis.2014.376



- See, R. E. (2002). Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(3), 517–529. doi:10.1016/S0091-3057(01)00682-7
- Sesack, S. R. y Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 27–47. doi:10.1038/npp.2009.93
- Shaffer, H. (1984). Abraham Wikler : Conditioning factors in opiate addiction. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 1(4), 277–278. doi: 10.1016/0740-5472(84)90007-2
- Simon, G. M. y Cravatt, B. F. (2006). Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26465–26472. doi:10.1074/jbc.M604660200
- Simon, G. M. y Cravatt, B. F. (2008). Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9341–9349. doi:10.1074/jbc.M707807200
- Singer, B. F., Bubula, N., Li, D., Przybycien-Szymanska, M. M., Bindokas, V. P. y Vezina, P. (2016). Drug-paired contextual stimuli increase dendritic spine dynamics in select nucleus accumbens neurons. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, (May), 1–10. doi:10.1038/npp.2016.39
- Skinner, B. F. (1938). The behavior of organisms. *Appleton-Century-Crofts, New York*.
- Solinas, M., Panlilio, L. y Antoniou, K. (2003). The Cannabinoid CB1 antagonist N-Piperidiny-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed ratio, and progressive ratio. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(1), 93–102. doi:10.1124/jpet.102.047928.is
- Solinas, M., Yasar, S. y Goldberg, S. R. (2007). Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 56(5), 393–405. doi:10.1016/j.phrs.2007.09.005
- Sørensen, G., Wörtwein, G., Fink-Jensen, A. y Woldbye, D. P. D. (2013). Neuropeptide Y Y5 receptor antagonism causes faster extinction and attenuates reinstatement in cocaine-induced place preference. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 105, 151–156. doi:10.1016/j.pbb.2013.02.010
- Spronk, D. B., van Wel, J. H. P., Ramaekers, J. G. y Verkes, R. J. (2013). Characterizing the cognitive effects of cocaine: a comprehensive review.



- Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1838–1859.
doi:10.1016/j.neubiorev.2013.07.003
- Starosciak, A. K., Zakharova, E., Stagg, M., Matos, J. y Izenwasser, S. (2012). Differential alteration of the effects of MDMA (ecstasy) on locomotor activity and cocaine conditioned place preference in male adolescent rats by social and environmental enrichment. *Psychopharmacology*, 224(1), 101–108.
doi:10.1007/s00213-012-2783-0
- Steketee, J. D. (2005). Cortical mechanisms of cocaine sensitization. *Critical Reviews in Neurobiology*, 17(2), 69–86. doi: 10.1615/CritRevNeurobiol.v17.i2.20
- Stewart, J. y Vezina, P. (1988). A comparison of the effects of intra-accumbens injections of amphetamine and morphine on reinstatement of heroin intravenous self-administration behavior. *Brain Research*, 457(2), 287–294. doi:10.1016/0006-8993(88)90698-1
- Strang, J., Babor, T., Caulkins, J., Fischer, B., Foxcroft, D. y Humphreys, K. (2012). Drug policy and the public good: evidence for effective interventions. *Lancet*, 379(9810), 71–83. doi:10.1016/S0140-6736(11)61674-7
- Striplin, C. D. y Kalivas, P. W. (1992). Correlation between behavioral sensitization to cocaine and G protein ADP-ribosylation in the ventral tegmental area. *Brain Research*, 579(2), 181–186. doi:10.1016/0006-8993(92)90049-F
- Suardíaz, M., Estivill-Torrús, G., Goicoechea, C., Bilbao, A. y Rodríguez de Fonseca, F. (2007). Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain*, 133(1-3), 99–110. doi:10.1016/j.pain.2007.03.008
- Sulcova, E., Mechoulam, R. y Frider, E. (1998). Biphasic effects of anandamide. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(2), 347–352. doi: 10.1016/S0091-3057(97)00422-X
- Sun, Y., Alexander, S. P. H., Kendall, D. A. y Bennett, A. J. (2006). Cannabinoids and PPAR α signalling. *Biochemical Society Transaction*, 34, 1095–1097. doi: 10.1042/BST0341095
- Sun, Y. y Bennett, A. (2007). Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Research*, 2007, 23513. doi:10.1155/2007/23513
- Sun, Y., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M. y Kudo, I. (2004). Biosynthesis of anandamide and N -palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A 2 and lysophospholipase D. *Biochemical Journal*, 380, 749–756. doi: 10.1042/BJ20040031
- Takeda, H., Tsuji, M. y Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, 350(1), 21–29. doi:10.1016/S0014-2999(98)00223-4

- Tanda, G. (2007). Modulation of the endocannabinoid system: therapeutic potential against cocaine dependence. *Pharmacological Research*, 56(5), 406–417. doi:10.1016/j.phrs.2007.09.001
- Tella, S. y Goldberg, S. (1998). Monoamine transporter and sodium channel mechanisms in the rapid pressor response to cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(2), 305–312. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305797004486>
- Tenk, C. M., Kavaliers, M. y Ossenkopp, K.-P. (2005). Dose response effects of lithium chloride on conditioned place aversions and locomotor activity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 515(1-3), 117–127. doi:10.1016/j.ejphar.2005.04.007
- Thomas, M. J., Kalivas, P. W. y Shaham, Y. (2008). Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 327–342. doi:10.1038/bjp.2008.77
- Thomsen, M. y Caine, S. B. (2006). Cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement: comparison of C57BL/6J, 129X1/SvJ, and 129S6/SvEvTac inbred mice. *Psychopharmacology*, 184(2), 145–154. doi:10.1007/s00213-005-0207-0
- Torregrossa, M. M., Corlett, P. R. y Taylor, J. R. (2011). Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4), 609–623. doi:10.1016/j.nlm.2011.02.014
- Tsuboi, K., Okamoto, Y., Rahman, I. A. S., Uyama, T., Inoue, T., Tokumura, A. y Ueda, N. (2015). Glycerophosphodiesterase GDE4 as a novel lysophospholipase D: a possible involvement in bioactive N-acylethanolamine biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(5), 537–548. doi:10.1016/j.bbailip.2015.01.002
- Ueda, N., Puffenbarger, R. A., Yamamoto, S. y Deutsch, D. G. (2000). The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chemistry and Physics of Lipids*, 108(1-2), 107–121. doi:10.1016/S0009-3084(00)00190-0
- Vanderschuren, L. J. M. J. y Kalivas, P. W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151(2-3), 99–120. doi:10.1007/s002130000493
- Veizina, P. (1996). D1 Dopamine sensitization receptor activation is necessary for the induction by amphetamine in the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Neuroscience*, 76(7), 2411–2420.
- Veizina, P. y Leyton, M. (2009). Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 160–168. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.070



- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Hitzemann, R., Logan, J., Schlyer, D. J. et al. (1993). Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse (New York, N.Y.)*, *14*(2), 169–177. doi:10.1002/syn.890140210
- Volkow, N. D., Gene-Jack, W., Fowler, J. S., Logan, J. C., Gatley, S. J., Gifford, A. et al. (1999). Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. *The American Journal of Psychiatry*, *156*(9), 1440–1443. doi: 10.1176/ajp.156.9.1440
- Volkow, N. D., Wang, G., Fowler, J. S., Logan, J., Gatley, S. J., Hitzemann, R. et al. (1997). Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature*, *386*((6627)), 830–833. doi: 10.1038/386830a0
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Thanos, P., Logan, J., Gatley, S. J. et al. (2002). Brain DA D2 receptors predict reinforcing effects of stimulants in humans: Replication study. *Synapse*, *46*(2), 79–82. doi:10.1002/syn.10137
- Volkow, N., Fowler, J. y Wolf, A. (1990). Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *The American Journal of Psychiatry*, *147*(6), 719–724. doi: 10.1176/ajp.147.6.719
- Wagner, F. A. y Anthony, J. C. (2002). From first drug use to drug dependence: Developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology*, *26*, 479–488. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00367-0
- Wang, B., Shaham, Y., Zitzman, D., Azari, S., Wise, R. A. y You, Z. B. (2005). Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(22), 5389–5396. doi:10.1523/JNEUROSCI.0955-05.2005
- Weiss, F., Ciccocioppo, R., Parsons, L. H., Katner, S., Liu, X. I. U., Zorrilla, E. P. et al. (2001). Compulsive drug-seeking behavior and relapse neuroadaptation, stress and conditioning factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *937*, 1–26. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03556.x
- White, F. J. y Kalivas, P. W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, *51*(1-2), 141–153. doi:10.1016/S0376-8716(98)00072-6
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(6), 483–94. doi:10.1038/nrn1406
- Wise, R. A. (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, *51*(1-2), 13–22. doi:10.1016/S0376-8716(98)00063-5
- Wise, R. A. y Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review*, *94*(4), 469–492. doi:10.1037//0033-295X.94.4.469

- Yu, H. L., Deng, X. Q., Li, Y. J., Li, Y. C., Quan, Z. S. y Sun, X. Y. (2011). N-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Pharmacological Reports*, 63(3), 834–839. doi:10.1016/S1734-1140(11)70596-5
- Zan, G. Y., Wang, Q., Wang, Y. J., Chen, J. C., Wu, X., Yang, C. H. et al. (2016). p38 mitogen-activated protein kinase activation in amygdala mediates κ opioid receptor agonist U50,488H-induced conditioned place aversion. *Neuroscience*, 320, 122–128. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.052
- Zhou, W., Zhang, C. A. F., Tang, S., Liu, H., Lai, M. y Yang, G. (2004). Low dose of heroin inhibits drug-seeking elicited by cues after prolonged withdrawal from heroin self-administration in rats. *Neuroreport*, 15(4), 727–730. doi:10.1097/01.wnr.0000095491.38740.54
- Zygmunt, P., Petersson, J. y Andersson, D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(July), 452–456. Recuperado de <http://www.nature.com/nature/journal/v400/n6743/abs/400452a0.html>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA