

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 664**

51 Int. Cl.:
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03750512 .0**
96 Fecha de presentación: **10.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1539149**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Combinaciones de antagonistas del receptor metabotrópico de glutamato y su uso en el tratamiento de trastornos adictivos**

30 Prioridad:
10.09.2002 US 409867 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH y
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**

72 Inventor/es:
**MARKOU, Athina;
KENNY, Paul;
PATERSON, Neil y
SEMENOVA, Svetlana**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 381 664 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Combinaciones de antagonistas del receptor metabotrópico de glutamato y su uso en el tratamiento de trastornos adictivos

Campo de la invención

- 5 La presente invención, en general se relaciona con métodos para tratar los trastornos asociados con el receptor metabotrópico de glutamato, y más específicamente con los métodos para tratar los trastornos asociados con el receptor metabotrópico de glutamato 2, 3, y 5.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores de glutamato juegan un papel en numerosos trastornos neurológicos, neurodegenerativos, psiquiátricos y psicológicos, y una variedad de estados de enfermedad de mamífero se asocian con la actividad aberrante de estos receptores. Los receptores de glutamato se han clasificado como "ionotrópicos" o "metabotrópicos". Los receptores ionotrópicos se acoplan directamente a la apertura de los canales catiónicos en las membranas celulares de la neurona. Los receptores metabotrópicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G y se acoplan a los sistemas que producen una hidrólisis de fosfoinositida mejorada, 15 activación de la fosfolipasa D, aumento o disminución en formación de cAMP, y cambios en la función del canal iónico.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) se dividen en tres grupos basándose en la homología de la secuencia de aminoácido, mecanismo de transducción y la selectividad de enlace: Grupo I, Grupo II y Grupo III. El Grupo I incluye el receptor metabotrópico de glutamato 1 y 5 (mGluR1 y mGluR5), el Grupo II incluye el receptor metabotrópico de glutamato 2 y 3 (mGluR2 y mGluR3), y el Grupo III incluye el receptor metabotrópico de glutamato 4, 6, 7, y 8 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8). Cada tipo de mGluR se puede encontrar en varios subtipos. Por ejemplo, los subtipos de mGluR1 incluyen mGluR1a, mGluR1b y mGluR1c. 20

Sólo recientemente los investigadores han empezado a clarificar los papeles fisiológicos para cada grupo mGluR. Por ejemplo, receptor metabotrópico de glutamato del grupo II (mGluII), que incluye los receptores mGlu2 y mGlu3, son autoreceptores inhibidores, localizados principalmente en aferentes glutamatérgicas en todo el cerebro de mamíferos donde ellos disminuyen la transmisión del glutamato de excitación (Cartmell and Schoepp, J Neurochem 75:889-907, 2000). Los receptores GABA_B, que comparten la homología funcional y estructural cercana con los receptores mGluII (Schoepp, J. Pharmacol. Exp. Ther., 299:12-20, 2001), también regulan negativamente la transmisión del glutamato. Recientemente, se demostró que la activación de los receptores mGluII y GABA_B disminuye la transmisión del glutamato de excitación en el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (NAcc) (Bonci et al., Eur. J. Neurosci., 9:2359-2359, 1997; Xi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 300:162-171, 2002; Erhardt et al., Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 365:173-180, 2002), lo que sugiere que estos receptores pueden regular la actividad del circuito de recompensa del cerebro. En consecuencia, se demostró que LY314582 y CGP44532, los agonistas en los receptores mGluII y GABA_B respectivamente, elevan los umbrales de recompensa de auto estimulación intracerebral (ICSS) en las ratas sin tratamiento previo con el fármaco (Macey et al., Neuropharmacology, 40:676-685, 2001; Harrison et al., Psychopharmacology, 160:56-66, 2002), demostrando que los receptores de mGluII y GABA_B regulan negativamente la función de recompensa del cerebro. 25 30 35

Además, se acumula la evidencia que la función de los receptores mGluII y GABA_B aumenta durante el desarrollo de la drogodependencia. Por ejemplo, el tratamiento prolongado con morfina, cocaína o amfetamina aumentó la regulación inhibitoria de la transmisión del glutamato por los receptores mGluII y GABA_B localizados en el VTA y NAcc (Manzoni and Williams, J. Neurosci., 19:6629-6636, 1999; Xi et al., Soc. Neurosci., Abstr 27: 2596, 2001; Giorgetti et al., Neuroscience, 109:585-595, 2002). 40

Fundyus et al (British journal of Pharmacology, Vol 120, 1997, pages 1015- 1020) describen que ciertos moduladores de mGluR se pueden utilizar para prevenir los trastornos adictivos no estabilizados. Chiamulera et al (Nature Neuroscience, Vol 4 (9), 2001, pages 873 -874) describen que los antagonistas de mGluR5 son útiles para tratar trastornos adictivos. 45

Los intentos para aclarar los papeles fisiológicos del mGluRs del Grupo I, sugieren que la activación de estos receptores provoca la excitación neuronal. La evidencia indica que esta excitación se debe a la activación directa del mGluRs postsinápticos, pero también se ha sugerido que la activación de mGluRs presinápticos ocurre, resultando en el aumento de la liberación de neurotransmisores (Baskys, Trends Pharmacol. Sci. 15:92, 1992, Schoepp, Neurochem. Int. 24:439, 1994, Pin et al., Neuropharmacology 34:1, 1995). De esta manera, se ha propuesto que los antagonistas para los mGluRs del Grupo I, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos tales como demencia senil, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, Corea de Huntington, dolor, epilepsia, y traumatismo craneal. 50

Sin embargo, se sabe menos acerca de los potenciales beneficios terapéuticos que se pueden realizar como resultado del antagonismo simultáneo de los mGluRs que pertenecen a grupos diferentes. Adicionalmente, poco se conoce acerca de si los antagonistas de mGluRs son útiles para tratar trastornos tales como abuso de sustancias. La invención se ocupa de estos temas y además proporciona ventajas relacionadas.

5 Resumen de la invención

La presente invención proporciona el objeto como se revela en las reivindicaciones.

Esta divulgación abarca los métodos para tratar los trastornos asociados con los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluRs) mediante la inhibición simultánea de al menos dos mGluRs que pertenecen a al menos dos diferentes grupos.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1 es una representación esquemática de las secciones coronarias del cerebro de rata, que muestran reconstrucción histológica de los sitios de inyección en el área tegmental ventral (5.30-6.72 mm posterior a bregma, de acuerdo con el atlas de Paxinos and Watson, 1986). Los círculos negros indican las ubicaciones de las puntas de inyección localizadas dentro del VTA y se incluyen en el análisis estadístico. Los datos de las ratas con sitios de inyección localizados fuera del VTA se retiraron del análisis.

Figuras 2A-2B ilustran los efectos de LY314582 en los umbrales de ICSS y las latencias de respuesta en las ratas control y tratadas con nicotina. Fig. 2A, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) del umbral basal. Fig. 2B, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) de la latencia de respuesta basal. ** $P < 0.01$, diferente de las ratas tratadas con nicotina después de la inyección del vehículo. ### $P < 0.01$, diferente de las ratas control después de la inyección con la misma dosis de LY314582.

Figuras 3A-3B ilustran los efectos del área intra-ventral tegmental LY314582 en umbrales de ICSS y las latencias de respuesta en las ratas control y tratadas con nicotina. Fig. 3A, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) del umbral basal. Fig. 3B, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) de la latencia de respuesta basal. *** $P < 0.001$, diferente de las ratas tratadas con nicotina después de la inyección del vehículo. ### $P < 0.01$, # $p < 0.05$, diferente de las ratas control después de la inyección con la misma dosis de LY314582.

Figuras 4A-4B ilustran los efectos de LY341495 en las elevaciones en umbrales de ICSS en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina. Figura 4A, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) del umbral basal en las ratas que experimentan abstinencia de la nicotina. Figura 4B, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) del umbral basal en las ratas control. Los umbrales de ICSS y las latencias de respuesta fueron probadas 12, 18, 24, 36, 48 y 72 h después de la retirada quirúrgica de mini-bombas osmóticas de administración de la nicotina (Fig. 3A) o vehículo (Fig. 3B). Las ratas recibieron una única inyección de LY341495 (1 mg/kg) o vehículo 30 min antes del punto de tiempo de 18 h (indicado por la flecha negra). *** $P < 0.001$, diferente de ratas que experimentan abstinencia de la nicotina tratadas con vehículo 30 min antes del punto de tiempo de 18 h.

Figura 5 ilustra los efectos de NBQX en umbrales de ICSS y latencias de respuesta en las ratas control y tratadas con nicotina. A, Los datos se expresan como media de variación de porcentaje (\pm SEM) del umbral basal. B, Los datos se expresan como la media de la variación de porcentaje (\pm SEM) de la latencia de respuesta basal. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, diferente de ratas tratadas con nicotina después de la inyección del vehículo. # $P < 0.05$, ## $p < 0.01$, diferente de las ratas control después de la inyección con la misma dosis de NBQX.

Figura 6 ilustra los efectos de la administración de MPEP sobre la respuesta continuada al alimento y a la nicotina en la rata. Los datos se expresan como porcentaje de la respuesta basal (media \pm SEM). Los asteriscos indican las diferencias significativas de las condiciones de control para cada refuerzo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figuras 7A-7D ilustran las curvas de respuesta-dosis de nicotina obtenidas después del pretratamiento con diferentes dosis de MPEP (media \pm SEM). Las gráficas en esta figura representan las curvas de respuesta-dosis de nicotina obtenidas después del pretratamiento con 0 (Fig. 7A), 5 (Fig. 7B), 10 (Fig. 7C) y 20 (Fig. 7D) mg/kg de MPEP. Los círculos negros son los resultados de controles de solución salina (los mismos datos repetidos en todos los cuatro paneles) y cuadrados abiertos son los resultados de los sujetos tratados con MPEP. El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el valor de criterio R, para las diferentes dosis de nicotina disponibles en comparación con la solución salina. Los signos de almohadilla (#) indican las diferencias significativas de la auto-administración de la dosis de nicotina de 0.048 $\mu\text{g}/\text{inf}$ para cada dosis de MPEP (5, 10 y 20 mg/kg) en comparación con el pretratamiento con solución salina ($p < 0.05$).

Figuras 8A-8B ilustran el efecto de la administración de MPEP en la auto-administración intravenosa de 0.048 µg/inf de nicotina en ratones DBA/2J (media ± SEM). El panel A (panel izquierdo) representa los efectos de pretratamiento de MPEP en la auto-administración de esta dosis de nicotina auto-administrada de forma fiable (0.048 µg/inf de nicotina). El panel B (panel derecho) muestra la dosis de nicotina auto-inyectada total cuando 0.048 µg/inf de nicotina estaban disponibles después del pretratamiento con MPEP (0, 5, 10 y 20 mg/kg). Los asteriscos (*) indican las diferencias significativas después del pretratamiento con cada dosis de MPEP (5, 10 y 20 mg/kg) en comparación con el pretratamiento con solución salina ($p < 0.05$).

Figuras 9A-9B ilustran los efectos de administración de MPEP en la respuesta a la cocaína en las ratas de Acceso Corto (ShA) y de Acceso Largo (LgA). La Figura 9A muestra el desarrollo de escalada en el consumo de cocaína, en las ratas LgA; los datos se expresan como valores base. La Figura 9B muestra los efectos de MPEP en las ratas ShA y LgA como porcentaje de la respuesta basal (media ± SEM). El panel C indica los efectos de MPEP en la auto-administración de la cocaína (los datos se expresaron como porcentaje de la respuesta basal (media + SEM) con ratas ShA y LgA combinadas). Los asteriscos indican las diferencias significativas de las condiciones de control para cada refuerzo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Figura 10 ilustra los efectos de MPEP en la respuesta continuada al alimento, a la nicotina y a la cocaína bajo una programación de refuerzo de proporción progresiva. Los datos se presentan como el número promedio (± SEM) de infusiones/pellets de alimento obtenidos después del pretratamiento de MPEP (eje ordinal de la izquierda). El eje ordinal de la derecha muestra las tasas finales correspondientes (i.e., puntos de quiebre) alcanzadas.

Figura 11 ilustra los efectos de administración de MPEP sobre la magnitud de reducción inducida por la cocaína de los umbrales de recompensa de ICSS (a) y los efectos sobre las latencias de respuesta en el mismo procedimiento (b). Los datos se expresan como porcentaje del valor basal (media ± SEM). * $P < 0.05$, *** $p < 0.001$ del control; # $p < 0.05$ comparado con las ratas tratadas de forma similar con la misma dosis de MPEP, pero no recibieron cocaína.

Figura 12 ilustra los efectos de administración de MPEP sobre la duración de la reducción inducida por la cocaína de los umbrales de recompensa de ICSS (a) y los efectos sobre las latencias de respuesta (b). Los datos se expresan como porcentaje del valor basal (media ± SEM). *** $p < 0.001$ del control.

Figura 13 ilustra los efectos de administración de LY341495 (0.1-5 mg/kg) sobre la respuesta a la nicotina en las ratas. Los datos se expresan como porcentaje de la respuesta basal (media ± SEM).

Figura 14 ilustra los efectos de LY341495 (0.5 mg/kg) solo, o en combinación con una dosis de MPEP (1 mg/kg) mostrados previamente (ver Fig. 13 arriba) que no tienen efecto por sí mismo sobre el consumo de la cocaína, sobre la respuesta a la nicotina en las ratas. Los datos se expresan como porcentaje de la respuesta basal (media ± SEM).

Figura 15 ilustra los efectos de LY341495 (1 mg/kg) combinado con MPEP (1 mg/kg) sobre la respuesta a la nicotina en las ratas. Los datos se expresan como porcentaje de la respuesta basal (media ± SEM).

Figura 16 ilustra los efectos de LY341495 (1 mg/kg) y de la combinación de los fármacos LY341495 y MPEP (1 mg/kg y 9 mg/kg, respectivamente) sobre los puntos de quiebre (i.e., la proporción fija más alta alcanzada, representada a la derecha del eje-y) y número de inyecciones de nicotina obtenidos (representados a la izquierda del eje-y) bajo una proporción progresiva de refuerzo que refleja la motivación para el consumo de fármacos. MPEP potenció las disminuciones del punto de quiebre inducidas por LY341495. Los datos se presentan como la media (± SEM) del número de infusiones obtenidos después de los tratamientos farmacológicos (eje ordinal de la izquierda). El eje ordinal de la derecha muestra las tasas finales correspondientes (i.e., puntos de quiebre) alcanzadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en los siguientes hallazgos:

a) El bloqueo de los receptores mGlu2 y mGlu3 por un antagonista de mGluR2 y mGluR3 (también denominado como un "antagonista del receptor mGlu2/3"), por ejemplo mediante la administración del antagonista del receptor mGlu2/3 LY341495, se atenúan los aspectos similares a la depresión de la abstinencia de la nicotina en las ratas;

b) El tratamiento con un antagonista del receptor mGlu5, tal como MPEP, disminuye el consumo de la cocaína y la nicotina en las ratas y ratones.

c) El tratamiento con un antagonista de los receptores mGlu2 y mGlu3, tal como LY341495, disminuye el consumo de nicotina en las ratas;

d) La co-administración de una dosis de un antagonista del receptor mGlu5, tal como MPEP a 1 mg/kg, que no tiene efectos en la auto-administración de cocaína o nicotina, potencia los efectos inhibidores de un antagonista del receptor mGlu2/3, tal como LY341495 (0.5 mg/kg o 1 mg/kg), en la auto-administración de la nicotina; y

5 e) La combinación de un antagonista del receptor mGlu5 a una concentración que disminuye la auto-administración de la cocaína o de la nicotina cuando se administra solo, por ejemplo, 9 mg/kg de MPEP, cuando se combina con un antagonista del receptor mGlu2/3 a una concentración que disminuye la auto-administración de la nicotina cuando se administra solo, tal como 1 mg/kg de LY341495, es más efectiva en la disminución de la auto-administración de la nicotina que cualquier fármaco solo.

Basándose en estos hallazgos, la presente invención proporciona el objeto como se revela en las reivindicaciones.

10 Se utiliza una combinación de antagonistas para lograr la inhibición de los receptores 2, 3, y 5. Por ejemplo, se utiliza la administración de un antagonista de mGluR2 y mGluR3 en combinación con un antagonista de mGluR 5, en algunos aspectos de la invención, para lograr la inhibición de mGluRs 2, 3, y 5. Por ejemplo, el antagonista de mGluR2 y mGluR3 LY341495, en combinación con el antagonista de mGluR5 MPEP, se puede administrar a un sujeto.

15 Adicionalmente, esta divulgación abarca

• una combinación que comprende (a) al menos un ingrediente activo seleccionado de un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 2 y un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 3, y (b) al menos un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 5, en la cual los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable; para uso simultáneo, por separado o secuencial, especialmente en el tratamiento de un trastorno adictivo;

20

• una combinación que comprende (a) al menos un ingrediente activo que muestra actividad antagonista contra el receptor metabotrópico de glutamato 2 y el receptor metabotrópico de glutamato 3, y (b) al menos un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 5, en la cual los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable; para uso simultáneo, por separado o secuencial, especialmente en el tratamiento de un trastorno adictivo.

25

Las combinaciones mencionadas anteriormente se pueden aplicar en la forma de una preparación combinada o una composición farmacéutica.

30 Adicionalmente, esta divulgación abarca

un método de tratamiento de un animal de sangre caliente que tiene un trastorno adictivo que comprende la administración al animal de una combinación según se ha definido anteriormente en una cantidad que es conjuntamente efectiva terapéuticamente contra un trastorno adictivo y en el cual los compuestos también pueden estar presentes en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables;

35 una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que es conjuntamente efectiva terapéuticamente contra un trastorno adictivo, de una combinación farmacéutica como se define anteriormente y al menos un portador farmacéuticamente aceptable; el uso de una combinación como se define anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno adictivo; y

40 un paquete comercial que comprende una combinación definida anteriormente junto con las instrucciones para uso simultáneo, por separado o secuencial de esta, en el tratamiento de un trastorno adictivo.

El término "una preparación combinada", como se utiliza en este documento define especialmente un "kit de partes" en el sentido que el primer y segundo ingrediente activo como se define anteriormente puede ser dosificado de forma independiente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los ingredientes, i.e., de forma simultánea o a diferentes intervalos de tiempo. Luego las partes del kit de partes, por ejemplo, pueden ser administradas de forma simultánea o escalonada cronológicamente, es decir a diferentes intervalos de tiempo y con igual o diferentes intervalos de tiempo para cualquier parte del kit de partes. Muy preferiblemente, los intervalos de tiempo se eligen de manera que el efecto en la enfermedad tratada en el uso combinado de las partes sea mayor que el efecto que debería ser obtenido mediante el uso de solo uno de los ingredientes activos. La proporción de las cantidades totales del ingrediente activo 1 con el ingrediente activo 2 que se administra en la preparación combinada se puede variar, por ejemplo, con el fin de hacer frente a las necesidades de una sub-población de pacientes que se trata o a las necesidades de un solo paciente cuyas diferentes necesidades se pueden deber a la edad, el sexo, el peso corporal, etc. de los pacientes. Preferiblemente, existe al

45

50

menos un efecto beneficioso, por ejemplo, una mejora mutua del efecto del primer y segundo ingrediente activo, en particular un sinergismo, por ejemplo un efecto más que aditivo, efectos ventajosos adicionales, menos efectos secundarios, un efecto terapéutico combinado en un dosificación no-efectiva de uno o ambos del primer y segundo ingrediente activo, y especialmente un fuerte sinergismo del primer y segundo ingrediente activo.

5 La actividad farmacológica de una combinación como se define anteriormente, por ejemplo, se puede evidenciar en estudios preclínicos conocidos como tal, por ejemplo en analogía a aquellos descritos en los Ejemplos.

La actividad farmacológica de una combinación como se define anteriormente, por ejemplo, también se puede demostrar en un estudio clínico. Tales estudios clínicos, preferiblemente son estudios clínicos aleatorizados, doble ciego, en pacientes con trastornos adictivos o depresión. Tales estudios demuestran, en particular, el sinergismo de los ingredientes activos de la combinación como se define anteriormente. Los efectos beneficiosos en trastornos adictivos se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios o mediante cambios en el diseño del estudio que se conoce como tal por un experto en la técnica.

Los antagonistas y agonistas de los receptores de mGlu se conocen en la técnica. Ejemplos de algunos antagonistas y agonistas conocidos se proporcionan en la Tabla a continuación y en los siguientes párrafos. Los agonistas incluyen agonistas no-selectivos: 1S, 3 R-ACPD; 1S,3 S-ACPD; L-CCG-1. Los antagonistas incluyen antagonistas de amplio espectro, no-selectivos tales como (S)-MCPG. Se debe entender que basándose en los principios de la presente invención, virtualmente cualquier antagonista de mGluR 2, 3, y/o 5 se puede utilizar para la presente invención. Sin embargo, preferiblemente para la presente invención, los antagonistas que son selectivos para mGlu R2, R3 y/o R5 se utilizan. Los antagonistas de mGluR2 se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, los compuestos revelados en U.S. Pat. No. 6,407,094 (Adam et al., (2002) y 1-[(Z)-2-Cicloheptiloxi-2-(2,6-dicloro-fenil)-vinil]-1H-[1,2,4]triazol (Kolczewski et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999, 9, 2173-2176). Los antagonistas de ambos mGluR2 y mGluR3 se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, LY341495 (Kingston et al. Neuropharm. 1998, 37, 1-12), LY366457 (O'Neill M.F., et al., Neuropharmacology, 45(5):565-74 (2003)), ácido (2S)-alfa-etilglutámico (EGLU) (Ver por ejemplo, Neto, F. L., et al., Neurosci. Lett. 15;296(1):25-8 (2000)), y ácido (2S,4S)-amino-4-(2,2-difeniletíl)pentanodioico (Escribano, A., et al., Bioorg. Med Chem. Lett., 7;8(7):765-70 (1998)). Los antagonistas de mGluR5 se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, MPEP (2-metil-6-(feniletinil)-piridina) y MTEP (3-(2-Metil-tiazol-4-il etinil)-piridina (Cosford, N.D., et al., J. Med. Chem., 46(2):204-6 (2003)). Los antagonistas de mGluR1 incluyen, por ejemplo, ácido 3-metilaminotiofeno dicarboxílico (3-MATIDA), (Moroni, F., Neuropharmacology, 42(6):741-51 (2002)). Los antagonistas de mGluR1 y mGluR5 (antagonistas del Grupo I), incluyen, por ejemplo, ácido 1-aminoindan-1,5-dicarboxílico (AIDA) (Ver por ejemplo, Renaud, J., et al., Epilepsia, 43(11):1306-17 (2002)), (3aS,6aS)-6a-naftalen-2-ilmetil-5-metiliden-hexahidro-ciclopenta[c]furan-1-on (BAY 36-7620) (Ver por ejemplo, De Vry, J., et al., Eur. J. Pharmacol. 5;428(2):203-14 (2001)), y el ciclobutilglicina (+/-)-2-amino-2-(ácido 3-cis y trans-carboxiciclobutil-3-(9-tioxantil)propionico) (LY393053) (Chen, U., et al., Neuroscience, 95(3):787-93 (2000)). Otros antagonistas de mGluR que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen aquellos revelados en WO99/08678.

La estructura de los ingredientes activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales se puede tomar de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o a partir de bases de datos, por ejemplo Patents International (por ejemplo IMS World Publications). Cualquier experto en la técnica está completamente capacitado para identificar los ingredientes activos y, basándose en estas referencias, así mismo capacitado para fabricar y evaluar las propiedades e indicaciones farmacéuticas en modelos de prueba estándar, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabla de Agonistas y Antagonistas de mGluR

Grupo	Subtipo del Receptor	Agonista del Receptor	Antagonista del Receptor
Grupo I	mGlu1	(S)-3,5-DHPG	LY 367385
		Quisqualato	(S)-4-CPG CPCCOEt
	mGlu5	(S)-3,5-DHPG (RS)-CHPG Z-CBQA	MPEP (S)-4-CPG MTEP
Grupo II	mGlu2	Quisqualato	LY341495
		LY354740	ADED
		LY379268	EGLu
	mGlu3	(2R,4R)-APDC	MSOP
		DCG-IV	LY341495
		LY354740	ADED
		LY379268	
		(2R,4R)-APDC	
		DCG-IV	

(continuación)

Grupo	Subtipo del Receptor	Agonista del Receptor	Antagonista del Receptor
Grupo III	mGlu4	L-AP4	DCG-IV
		LY379268	MAP4
		L-SOP	MSOP
		(RS)-PPG	MPPG
		CPPG	
	mGlu6	L-AP4	DCG-IV
		L-SOP	
		(RS)-PPG	
		(S)-HomoAMPA	
	mGlu7	L-SOP	DCG-IV
		(RS)-PPG	MPPG
	mGlu8	L-AP4	DCG-IV
		LY354740	MAP4
		LY379268	
		L-SOP	
		(RS)-PPG	

5 MPEP se puede preparar de acuerdo con los procedimientos químicos descritos en WO99/02497 o adquirir de Tocris, Ballwin, MO. LY341495 (ácido 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxiciclopropan-1-il)-3-(xanth-9-il)propionico) se puede adquirir de Tocris (Ballwin, MO). NBQX disódico (2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo(f)quinoxalina-7-sulfonamida disódico) se puede adquirir de Tocris, Ballwin, MO.

10 Como se utiliza en este documento, una "cantidad efectiva" de un antagonista es una cantidad que modula la actividad normal de los receptores mGlu 2, 3, o 5 en un sujeto. Una actividad "normal" del receptor mGlu representa un nivel de actividad en una célula o sujeto que no tiene un trastorno relacionado con mGluR y se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se revelan en este documento. Por ejemplo, LY341495 se puede administrar a una concentración de aproximadamente 0.1-50 mg/kg, en algunos aspectos entre 0.1 y 5 mg/kg. En algunos aspectos de la invención, una cantidad efectiva de LY341495 es al menos 0.5 mg/kg, por ejemplo, 0.5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o 0.5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. En ciertos aspectos de la invención, LY341495 se administra a una concentración de aproximadamente 0.5 mg/kg o 1 mg/kg.

15 MPEP, en algunos aspectos de la invención, se administra en una cantidad de aproximadamente 0.01 y 25 mg/kg de peso corporal. En ciertos aspectos, MPEP se administra a una concentración igual a o mayor de 1 mg/kg, por ejemplo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 mg/kg. En otros aspectos, MPEP se administra a una concentración entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 mg/kg. En otros aspectos, MPEP se administra entre aproximadamente 7 y aproximadamente 12 mg/kg, por ejemplo a 9 mg/kg.

20 En un aspecto de la invención, dos o más antagonistas se administran a cantidades sub-efectivas, por debajo de las cuales uno o más de los antagonistas son efectivos en el tratamiento del trastorno por sí mismo. Por ejemplo, un antagonista de mGluR5 se puede administrar a una cantidad sub-efectiva y un antagonista de mGluR2/mGluR3 se puede administrar a una cantidad efectiva, o viceversa. MPEP se puede administrar a 1 mg/kg o menos y LY341495 se puede administrar a una concentración efectiva, como se indica anteriormente. Por ejemplo, MPEP se puede administrar a 0.1-3 mg/kg y LY341495 se puede administrar a 0.5-5 mg/kg. En un aspecto ilustrado en el Ejemplo 3, MPEP se administra a 1 mg/kg y LY341495 se administra a 0.5 mg/kg. Además, otros aspectos específicos de la presente invención incluyen la combinación de 1 mg/kg de LY341495 y 1 mg/kg de MPEP; y 1 mg/kg de LY341495 y 9 mg/kg de MPEP. Como se ilustra en el Ejemplo 3, cuando se utiliza en combinación, un antagonista de mGluR5 mejora la efectividad en el tratamiento de un trastorno adictivo, tal como adicción a la nicotina, de un antagonista de mGluR2/R3. Como también se ilustra en el Ejemplo 3, cuando se utiliza en combinación, un antagonista de mGluR2/3 mejora la efectividad en el tratamiento de un trastorno adictivo, tal como adicción a la nicotina, de un antagonista de mGluR5. Se debe entender que la presente invención proporciona una base para otros estudios en humanos para determinar más precisamente las cantidades efectivas en humanos. Las dosis utilizadas en la sección de Ejemplos para estudios en roedores proporcionan una base para los rangos de dosis indicados en este documento para humanos y otros mamíferos.

25 En ciertos aspectos de la invención, por ejemplo, se administra una cantidad de uno o más antagonistas de mGluR2, o 3, y 5, que es suficiente para disminuir, inhibir, o eliminar el deseo de una sustancia adictiva tal como la cocaína o la nicotina. Adicionalmente, en algunos aspectos, se administra una cantidad de un antagonista de mGluR2, o 3, y 5 que es suficiente para disminuir, inhibir o eliminar las propiedades reforzantes de una sustancia adictiva, tal como la cocaína o la nicotina. La disminución, inhibición, y/o eliminación de cualquiera de estas características de las

enfermedades objeto por los métodos de la presente invención indican un tratamiento efectivo de un trastorno metabotrópico de glutamato.

Los trastornos que se pueden tratar efectivamente, mediante la modulación de la actividad de mGluRs 2, 3, y 5, denominados en este documento como trastornos metabotrópicos de glutamato, son trastornos adictivos. Los trastornos metabotrópicos de glutamato incluyen trastornos que involucran uno o ambos de un receptor metabotrópico de glutamato del Grupo I (mGluR) y uno o ambos de un mGluR del Grupo II. Los trastornos adictivos metabotrópicos de glutamato incluyen, por ejemplo, adicción a la nicotina, adicción al alcohol, adicción a los opiáceos, adicción a las anfetaminas, adicción a la cocaína, adicción a las metanfetaminas, y similares.

Se debe entender que los datos proporcionados en la sección de Ejemplos para ciertas drogas de abuso, tales como cocaína y nicotina, también son aplicables a otras drogas de abuso. Extensamente se ha planteado la hipótesis que la dependencia a todas las principales drogas de abuso, se media por los mismos mecanismos de comportamiento y neurobiológicos (Markou et al. 1998; Markou A & Kenny PJ 2002 Neuroadaptations to chronic exposure to drugs of abuse: Relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories, *Neurotoxicity Research*, 4(4), 297-313.; Koob & Le Moal, *Neuropsychopharmacology*, 24(2):97-129 2001; Barr, A.M., Markou, A. and Phillips, A.G. (2002) A "crash" course on psychostimulant withdrawal as a model of depression, *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(1), 475-482, incorporada en su totalidad por referencia; Cryan, J.F., Markou, A. and Lucki, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs, *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245). Por lo tanto, cabría esperar que también un compuesto efectivo en el tratamiento de una adicción a las drogas, probablemente sea efectivo en el tratamiento de otra adicción. Por ejemplo, el aumento en la neurotransmisión serotoninérgica mediante la co-administración del inhibidor de la reabsorción de la serotonina selectiva fluoxetine + el antagonista del receptor de la serotonina-1A p-MPPI, invierte los aspectos similares a la depresión de la abstinencia de tanto las anfetaminas como de la nicotina (Harrison, Liem & Markou, *Neuropsychopharmacology* 2001; incorporada en su totalidad por referencia). Además, la abstinencia de todas las principales drogas de abuso (nicotina, cocaína, anfetamina, alcohol, opiáceos, fenilciclidina) se traduce en elevaciones de los umbrales de recompensa del cerebro que reflejan un estado similar a la depresión (referencias de las revisiones Markou et al. 1998; Markou & Kenny 2002; Barr et al. 2002; Cryan et al. 2002; y referencia de la investigación original para fenilciclina: Spielewoy, C. & Markou, A. 2003, *Withdrawal from chronic treatment with phencyclidine induces long-lasting depression in brain reward function*, *Neuropsychopharmacology*, 28, 1106-1116 and cocaine: Ahmed et al. 2002). Por lo tanto, el tratamiento de tales aspectos similares a la depresión de la drogodependencia y de la abstinencia, puede ayudar a las personas en la abstinencia del consumo de fármacos.

En un aspecto, el trastorno adictivo es la adicción a la nicotina. En otro aspecto, el trastorno adictivo es la adicción a la cocaína. En otro aspecto, el trastorno adictivo es la adicción al alcohol. En otro aspecto, el trastorno adictivo es la adicción a los opiáceos. En otro aspecto, el trastorno adictivo es la adicción a las metanfetaminas. En otro aspecto, el trastorno adictivo es la adicción a las anfetaminas.

Esta divulgación abarca los métodos para tratar un trastorno metabotrópico de glutamato, en donde el sujeto es un sujeto mamífero, por ejemplo un sujeto humano que padece un trastorno del receptor metabotrópico de glutamato, por ejemplo adicción a la nicotina o adicción a la cocaína. Los ejemplos en este documento ilustran dichos métodos en roedores. Sin embargo, se entenderá que se espera que dichos métodos también sean eficaces en sujetos humanos, debido a la similitud entre los roedores y los humanos en la fisiología de trastornos adictivos (Markou et al. 1998; Markou and Kenny 2002, incorporada en su totalidad por referencia), y la estructura de los receptores de mGlu (Schoepp et al. *Neuropharm.* 1999, 38, 1431-1476). ; Schoepp DD (2001), *J Pharmacol Exp Ther* 299:12-20).

La "administración simultánea" de dos o más antagonistas es la administración de los antagonistas a un sujeto dentro de un periodo de tiempo suficientemente corto, de tal manera que una concentración suficiente de cada uno de los antagonistas está presente en el sujeto al mismo tiempo para modular sus objetivos del receptor de mGlu respectivos. Por lo tanto, será reconocido que la diferencia de tiempo máxima entre las administraciones de los antagonistas que representan la administración simultánea depende de la vida media de los antagonistas administrados, la cantidad administrada del antagonista, y el método y localización por la cual los antagonistas se administran, por ejemplo.

Para ciertos aspectos de los métodos revelados en este documento, los antagonistas se administran durante periodos de semanas, meses, años, y posiblemente de forma indefinida para los sujetos que presentan fracaso para abstenerse del consumo de fármacos.

Esta divulgación abarca un método para inhibir el consumo de fármacos, y/o el tratamiento el estado similar a la depresión asociado con el consumo de fármacos y su dependencia (Ahmed et al., 2002, incorporada en este documento en su totalidad por referencia), o con la abstinencia de la drogodependencia, incluyendo la administración a un sujeto que lo necesita, de una cantidad efectiva de al menos un antagonista que modula mGluR2 y/o mGluR3, tratando así el consumo de la sustancia adictiva, o el estado similar a la depresión de los estados de dependencia a una droga adictiva o la abstinencia a las drogas. Esta divulgación se basa en la evidencia experimental proporcionada en el Ejemplo 3, que el tratamiento con un antagonista de los receptores mGlu2/3, tales

como LY341495, disminuye el consumo de fármacos adictivos (por ejemplo, la nicotina) en las ratas, también como la evidencia proporcionada en el Ejemplo 1, que el tratamiento con un antagonista del receptor mGlu2/3, tal como LY341495, puede revertir el estado similar a la depresión asociado con la abstinencia a las drogas. La sustancia adictiva por ejemplo, es la nicotina o la cocaína. En ciertos aspectos, la cantidad efectiva de al menos un antagonista se administra para disminuir el consumo de la nicotina. Por ejemplo, en un aspecto se administra una cantidad efectiva de un antagonista de mGluR2 y mGluR3 tal como LY341495, para disminuir el consumo de la nicotina. En ciertos aspectos de esta divulgación, se administra un inhibidor de mGluR2 y/o mGluR3 mientras que un sujeto está experimentando la abstinencia. En otro aspecto de esta divulgación, se administra un inhibidor de mGluR2 y/o mGluR3 durante un periodo de tiempo cuando un sujeto se utiliza activamente una sustancia adictiva. En otro aspecto de esta divulgación, se administra un inhibidor de mGluR2 y/o mGluR3 durante un periodo de tiempo cuando un sujeto está experimentando activamente la depresión asociada con el consumo de fármacos.

Esta divulgación abarca un método para antagonizar al menos dos de mGluR2, mGluR3, y mGluR5, que incluye la administración de forma simultánea a un sujeto que lo necesita, de una cantidad de al menos dos antagonistas que modulan al menos dos de mGluR2, mGluR3, y mGluR5. La cantidad de cada antagonista es suficiente para modular su mGluR objetivo. Esta cantidad puede ser menor que la cantidad efectiva del antagonista cuando se administra solo. Sin embargo, la cantidad administrada en estas modalidades es suficiente para que la combinación de los antagonistas sea efectiva para tratar un trastorno metabotrópico. En ciertos aspectos, cada antagonista se proporciona a una cantidad efectiva para tratar un trastorno metabotrópico del glutamato. En ciertos aspectos, el sujeto es el que padece una adicción a la nicotina, o una adicción a la cocaína. En ciertos aspectos, se administra un antagonista que modula mGluR2 y mGluR3, junto con un antagonista que modula mGluR5. Por ejemplo, una cantidad efectiva de MPEP se puede administrar junto con una cantidad efectiva de LY341495. En ciertos aspectos, una cantidad sub-efectiva de MPEP se administra junto con una cantidad efectiva de LY341495. En ciertos aspectos, una cantidad efectiva de MPEP se administra junto con una cantidad sub-efectiva de LY341495. En ciertos aspectos, una cantidad sub-efectiva de MPEP se administra junto con una cantidad sub-efectiva de LY341495.

Esta divulgación abarca un método para tratar un trastorno adictivo, también denominado como abuso de sustancias, que incluye la administración a un sujeto que lo necesita, de una cantidad efectiva de al menos un antagonista que modula al menos uno de mGluR2, 3, y 5 durante un primer periodo de tiempo, seguido por la administración de al menos un antagonista que modula al menos uno de mGluR2 y/o 3, durante un segundo periodo de tiempo. El primer periodo de tiempo, por ejemplo, es un periodo de tiempo en donde el sujeto espera estar en un ambiente en el que, o se expone al estímulo en la presencia del cual, el sujeto habitualmente utiliza una sustancia adictiva, o en donde el sujeto se activa utilizando la sustancia adictiva. El segundo periodo de tiempo, por ejemplo, es un periodo de tiempo en donde el sujeto está sufriendo de la abstinencia. Un aspecto de esta divulgación confirmada, por ejemplo, incluye la administración de MPEP y/o LY341495 durante un primer periodo de tiempo, y la administración de LY341495 durante un periodo de abstinencia.

Este aspecto se basa en el hallazgo presentado en los Ejemplos en este documento, que la administración de un antagonista de mGluR5 y/o un antagonista de mGluR2/3 disminuye la auto-administración de una droga adictiva tal como la nicotina o la cocaína. Adicionalmente, este aspecto se basa en el hallazgo que la administración de un antagonista de mGluR2/3 invierte al menos alguno de los efectos negativos de la abstinencia de la nicotina. En un aspecto, se administran un antagonista de mGluR5 y un antagonista de mGluR2 y/o mGluR3 y se monitorean los síntomas similares a la depresión de la drogodependencia y de la abstinencia. Si los síntomas de la abstinencia se vuelven demasiado intensos, la administración del antagonista de mGluR5 se puede terminar al menos temporalmente, mientras que el antagonista de mGluR2/3 puede continuar siendo administrado.

La ruta de administración de los antagonistas empleados para la invención se determina por el trastorno particular. Los antagonistas se pueden administrar por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, y por vía intradérmica, también como, mediante una administración transdérmica (por ejemplo, con un portador soluble en lípidos en un parche para la piel colocado sobre la piel), o incluso por administración gastrointestinal (por ejemplo, con una cápsula o un comprimido). Adicionalmente, los antagonistas utilizados en los métodos revelados en este documento, en algunos aspectos se administran directamente al cerebro o ciertas regiones del cerebro para inhibir los receptores en sitios del cerebro que producen el efecto deseado sin inhibir los receptores en otros sitios del cerebro, evitando así indeseables efectos secundarios o acciones que puedan contrarrestar la acción terapéutica benéfica mediada por el o los sitios antiguos. La dosificación será suficiente para proporcionar una cantidad efectiva de un antagonista ya sea en forma individual o en combinación, como se discute anteriormente. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del paciente que se trata, y del médico, en cualquier caso, determinaran la dosis apropiada para el paciente individual. La dosis dependerá, entre otras cosas, del peso corporal, la fisiología, y el régimen de administración elegido.

Los antagonistas empleados en los métodos revelados en este documento se administran solos o en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables, ya sea en dosis individuales o múltiples. Los portadores farmacéuticos apropiados incluyen rellenos o diluentes sólidos inertes, soluciones acuosas estériles, y varios

solventes orgánicos no-tóxicos. Entonces las composiciones farmacéuticas formadas mediante la combinación de uno o más antagonistas con el portador farmacéuticamente aceptable son fácilmente administradas en una variedad de formas de dosificación tales como comprimidos, grageas, jarabes, soluciones inyectables, y similares. Estos portadores farmacéuticos pueden, si se desea, contener ingredientes adicionales tales como aromatizantes, aglutinantes, excipientes, y similares. Por lo tanto, para propósitos de administración oral, se emplean los comprimidos que contienen varios excipientes tales como citrato de sodio, carbonato de calcio, y fosfato de calcio junto con varios desintegrantes tales como almidón, y preferiblemente almidón de patata o tapioca, ácido alginico, y ciertos silicatos complejos, junto con agentes de enlace tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina, y acacia. Adicionalmente, agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, sodio lauril sulfato, y talco por lo general son útiles para los procesos de compresión. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en sal y cápsulas de gelatina dura rellenas y. Los materiales preferidos para este propósito incluyen lactosa o azúcar de la leche y polietilenglicoles de alto peso molecular.

Cuando las suspensiones acuosas de elixires se desean para la administración oral, los antagonistas se pueden combinar con varios agentes edulcorantes o saborizantes, materia coloreada o colorantes, y si se desea, agentes emulsificantes o de suspensión, junto con diluentes tales como agua, etanol, propileno glicol, glicerina, y combinaciones de estos. Para la administración parenteral, se emplean soluciones de preparación en aceite de sésamo o de cacahuete o en polipropileno glicol acuoso, también como soluciones salinas acuosas estériles de las correspondientes sales metálicas farmacéuticamente aceptables solubles en agua descritas previamente. Tal solución acuosa debe ser apropiadamente estandarizada, si es necesario y el primer diluyente líquido se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para la inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. Todos los medios acuosos estériles empleados se obtienen fácilmente mediante técnicas estándar bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Esta divulgación abarca kits que son útiles para llevar a cabo los métodos revelados en este documento. Los componentes de los kits dependen del método específico que tiene la intención de ser realizado por el kit. Por ejemplo, el kit puede ser útil para llevar a cabo un método para tratar un trastorno metabotrópico de glutamato. En este aspecto, el kit puede incluir al menos un contenedor que contiene un antagonista que modula el receptor metabotrópico de glutamato 2 (mGluR2), mGluR3, y/o mGluR5. En un aspecto, el kit incluye un primer contenedor con un inhibidor de mGluR5 y un segundo contenedor con un inhibidor de mGluR2 y/o mGluR3. En un aspecto, el kit incluye un contenedor de MPEP y un contenedor de LY341495. Los antagonistas incluidos en el kit de prueba se proporcionan en una cantidad y forma que sea suficiente para permitir que una cantidad efectiva sea administrada al sujeto. El kit por ejemplo, también puede incluir las instrucciones relacionadas con el uso efectivo de los antagonistas en el tratamiento de abuso de sustancias. El kit en algunos aspectos incluye la información que generalmente es útil para un individuo que sufre de una adicción.

La invención ahora será descrita con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos no-limitantes.

EJEMPLO 1

Los receptores metabotrópicos y ampa/kainato de glutamato del grupo II regulan el déficit en la función de recompensa del cerebro asociado con la abstinencia de nicotina en ratas

Este ejemplo ilustra que un antagonista de los receptores de mGluR2 y mGluR3 y posiblemente un agonista de los receptores de AMPA/Kainato de glutamato pueden bajar el déficit en función de recompensa del cerebro asociado con abstinencia de la nicotina en las ratas. La hipótesis de que abstinencia de la nicotina precipita un síndrome de abstinencia aversiva en fumadores humanos para proporcionar una fuente de motivación importante, que contribuye a la persistencia del hábito de fumar y las recaídas durante la abstinencia (Kenny and Markou, 2001). Los datos proporcionados en este ejemplo sugieren fuertemente un papel para el receptor metabotrópico de glutamato del grupo II en la generación de los déficit de recompensa asociados con la abstinencia de la nicotina, mientras se demuestra que la activación de los receptores mGluR1 precipitó las elevaciones del umbral de ICSS en las ratas dependientes a la nicotina similares a aquellos observados durante la abstinencia espontánea de la nicotina. Además, la activación de los receptores mGluR1 en el VTA también elevó los umbrales en las ratas dependientes a la nicotina, proporcionando otro soporte para un papel importante del VTA en la mediación de las acciones de la nicotina sobre las rutas de recompensa. De acuerdo con lo anterior, el bloqueo de los receptores mGluR1 atenúa el déficit de recompensa en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina. Por último, los datos proporcionados en este ejemplo también sugieren fuertemente un papel para el receptor metabotrópico AMPA/kainato de glutamato en la generación del déficit de recompensa asociado con la abstinencia de la nicotina mientras que se demuestra que el antagonismo de los receptores AMPA/kainato precipitó las elevaciones del umbral de ICSS en las ratas dependientes a la nicotina, similares a las observadas durante la abstinencia espontánea de la nicotina.

Materiales y métodos

Sujetos

- 5 Los sujetos fueron 149 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 300-320 g en el inicio de cada experimento. Las ratas fueron obtenidas de Charles River Laboratories (Raleigh, NC) y se hospedaron con alimento y agua disponible *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en un bioterio a temperatura controlada bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 hr (luces apagadas a las 10:00 am). En cada caso los animales fueron evaluados durante la parte de oscuridad del ciclo de luz/oscuridad, excepto para el experimento de abstinencia espontánea de la nicotina, cuando las ratas fueron probadas a puntos de tiempo de acuerdo con el diseño experimental.

Drogas

- 10 Sal (-)-tartrato hidrógeno de nicotina ((-)-1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina) y (+)-MK-801 maleato de hidrógeno (5R,10S)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,d)ciclohepten-5,1 0-imina maleato de hidrógeno) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; LY341495 (ácido 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxiciclopropan-1-il)-3-(xanth-9-il)propionico) y NBQX disódico (2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo(f)quinoxalina-7-sulfonamida disódico) fueron adquiridos de Tocris, Ballwin, MO. LY314582 (la mezcla racémica de LY354740 (ácido (+)-2-aminobencilo(3.1.0)hexano-2,6-dicarboxílico)) y MPEP (2-metil-6-(feniletinil)-piridina) fueron sintetizados. CGP44532 (ácido 3-Amino-2-(S)-hidroxipropil-metil-fosfínico) fue proporcionado generosamente por Novartis Pharma AG. Las drogas fueron preparadas inmediatamente antes de cada administración. Para la administración sistémica, todas las drogas se disolvieron en agua estéril y se administraron por inyección intraperitoneal, en un volumen de 1 ml/kg de peso corporal, 30 min antes de la sesión experimental. Para la administración intra-VTA directa, LY314582 se disolvió en fluido cerebroespinal artificial (aCSF) de la siguiente composición (en mM): NaCl 126.6, NaHCO₃ 27.4, KCl 2.4, KH₂PO₄ 0.5, CaCl₂ 0.89, MgCl₂ 0.8, Na₂HPO₄ 0.48 y glucosa 7.1, pH 7.4. Las ratas recibieron inyecciones intra-VTA inmediatamente antes del inicio de la sesión experimental. A menos que se indique de otra manera, la dosis del fármaco se refiere a la forma de sal.

Equipos

- 25 Las pruebas y los entrenamientos de auto-estimulación intracraneal se llevaron a cabo en dieciséis cámaras operantes de Plexiglas (25 x 31 x 24 cm) (Med Associates, St. Albans, VT). Una de las paredes contenía una rueda metálica manipulandum que necesita una fuerza de 0.2 N para girarla un cuarto de una vuelta. La rueda (5 cm de ancho) extendida fuera de la pared -3 cm. La estimulación intracraneal fue administrada por estimuladores de corriente constante. Los sujetos fueron conectados al circuito de estimulación a través de correas bipolares flexibles conectadas a conmutadores giratorios de contacto de oro, montados encima de la cámara. Los parámetros de estimulación, la recolección de los datos, y todas las funciones de la sesión de pruebas se controlaron por un microordenador.

Cirugía

- 35 *Colocación de los electrodos y las cánulas.* Las ratas fueron anestesiadas por inhalación de 1-3% de halotano en oxígeno y se colocaron en un marco esterotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA). La barra de los incisivos se ajustó a 5 mm encima de la línea interaural, y el cráneo se expone. Los electrodos bipolares de acero inoxidable (11 mm de longitud) fueron implantados en el hipotálamo lateral posterior (AP: -0.5 mm desde el bregma; ML: ±1.7 mm; DV: 8.3 mm desde la duramadre). Para el experimento de infusión VTA, las cánulas guía de acero inoxidable bilaterales se implantaron 3 mm arriba del VTA (AP: -3.2 mm desde el bregma; ML: ±1.7 mm; DV: 5.3 mm de la superficie del cráneo; ángulo de 10° desde la línea media), al mismo tiempo que los electrodos de ICSS se implantaron. Las cánulas se mantuvieron patentes utilizando estiletes de acero inoxidable de 14 mm de largo (calibre 30). A los animales se les permitió recuperarse de la cirugía durante al menos 7 días antes del entrenamiento en el paradigma de ICSS.

Cirugía de mini-bomba osmótica.

- 45 Las ratas fueron anestesiadas por inhalación de 1-3% de halotano en oxígeno y se prepararon con minibombas osmóticas Alzet (modelo 2ML4 (28 días); Alza Corporation, Palo Alto, CA) colocadas por vía subcutánea (parte posterior al animal paralelo a la espina dorsal). Las bombas se llenaron con agua estéril o solución de la sal de nicotina. La concentración de la solución de la sal de nicotina se ajustó de acuerdo con el peso corporal del animal, resultando en la administración de 9 mg/kg/día (3.16 mg/kg, base libre). Esta dosis de nicotina mantiene los niveles en plasma estables (-44 ng/ml) comparable a aquellos obtenidos en fumadores humanos que consumen aproximadamente 30 cigarrillos por día (Benowitz, 1988, N Engl J Med 319:1318-1330). Después de la implantación de la mini-bomba (o retirada), la herida quirúrgica se cerró con 9 mm de grapas para heridas de acero inoxidable y se trató con ungüento de antibiótico tópico (Bacitracina).

Procedimiento de umbral de recompensa de auto-estimulación intracraneal

Los animales fueron entrenados para responder de acuerdo con una modificación del procedimiento del umbral de corriente de la prueba discreta de Kornetsky and Esposito (Fed Proc 38:2473-2476, 1979), que ha sido descrito con detalle previamente (Markou and Koob, 1992 Physiol Behav 51:111-119). Brevemente, una prueba se inició mediante la administración de un estímulo eléctrico no-contingente. Este refuerzo eléctrico tuvo una duración de entrenamiento de 500 ms y consistió de pulsos catódicos rectangulares de 0.1 ms que fueron administrados a una frecuencia de 50-100 Hz. La intensidad de la corriente suministrada se ajustó para cada animal y por lo general varío de 50 a 200 μ A. Un giro de rueda de un cuarto dentro de 7.5 seg de la administración del estímulo eléctrico no-contingente dio lugar a la administración de un estímulo eléctrico idéntico en todos los parámetros para el estímulo no-contingente que inició la prueba. Después de un intervalo inter-ensayo variable (7.5-12.5 seg, media de 10 seg), otro ensayo se inició con la administración de un estímulo eléctrico no-contingente. La falta de respuesta para el estímulo no-contingente dentro de 7.5 seg dio lugar al inicio del intervalo inter-ensayo. La respuesta durante el intervalo inter-ensayo retrasó el inicio de la siguiente prueba por 12.5 seg. Los niveles de corriente se variaron en la alternancia de serie descendente y ascendente. Un conjunto de tres ensayos se presentó para cada intensidad de corriente. Las intensidades de corriente se alteraron en etapas de 5 μ A. En cada sesión de la prueba, cuatro alternancias de series descendente-ascendente se presentaron. El umbral para cada serie se definió como el punto medio entre dos intensidades de corriente consecutivas que produjeron "puntuaciones positivas" (los animales respondieron a al menos dos de los tres ensayos) y dos intensidades de corriente consecutivas que produjeron "puntuaciones negativas" (los animales no responden a dos o más de los tres ensayos). El umbral general de la sesión se definió como la media de los umbrales para las cuatro series individuales. Cada sesión de la prueba tuvo - 30 min de duración. La latencia entre el inicio de los estímulos no-contingentes y una respuesta positiva fue registrada como la latencia de respuesta. La latencia de respuesta para cada sesión de la prueba se definió como la media de la latencia de respuesta de todos los ensayos durante los cuales una respuesta positiva ocurre. Después del establecimiento de los umbrales estables de ICSS de recompensa, las ratas fueron probadas en el procedimiento de ICSS una vez al día excepto para el experimento de abstinencia espontánea de la nicotina, cuando las ratas fueron evaluadas a puntos de tiempo de acuerdo con el diseño experimental.

Procedimiento de inyección intracerebral

Todas las inyecciones se administraron de forma bilateral en un volumen de 0.5 μ l/lado dado durante 66 seg a través de inyectores de 17 mm. Los inyectores se conectaron a una tubería-10 calibrada de polietileno precargada con solución de droga y sobresaliendo 3 mm por debajo de los extremos de las cánulas en el VTA. Después de la infusión, los inyectores se mantienen en su lugar por otros 60 seg para permitir la difusión del fármaco. Luego los inyectores se retiraron y se recolocaron con estiletes de alambre de 14 mm, y a continuación los animales se colocaron directamente en el equipo de prueba de ICSS. Las inyecciones se hicieron utilizando una bomba de microinfusión Harvard (Modelo 975).

Diseño experimental

Experimentos de administración sistémica. Estos experimentos investigaron si la abstinencia de la nicotina, según se mide por las elevaciones en los umbrales de ICSS, se podría precipitar en las ratas tratadas con nicotina mediante la administración sistémica de un agonista en los receptores mGlu1 (LY314582), un agonista en los receptores GABA_B (CGP44532), o antagonistas de los receptores mGlu5 (MPEP), NMDA (MK-801) o AMPA/Kainato (NBQX) de glutamato. Las ratas fueron entrenadas para cada droga probada, en el paradigma de ICSS hasta que se logró una respuesta basal estable, definida como la variación $\leq 10\%$ en los umbrales para 3 días consecutivos y que requiere aproximadamente 14 días de pruebas diarias. En cada caso, las ratas sin tratamiento previo con el fármaco luego fueron asignadas a dos grupos separados de tal manera que no hubo diferencia en la media de los umbrales de ICSS basales o del peso corporal entre los grupos. A continuación, un grupo fue preparado con mini-bombas osmóticas subcutáneas que administran el vehículo y el segundo grupo con mini-bombas que administran 9 mg/kg/día de hidrógeno tartrato de nicotina (3.16 mg/kg/día de base libre de nicotina). Hubo un intervalo mínimo de siete días después de la implantación de la mini-bomba, durante el cual los umbrales de recompensa de ICSS continuaron siendo medidos diariamente, antes fue evaluado el efecto de cualquier droga administrada sistemáticamente en los umbrales de recompensa. Este periodo de tiempo fue suficiente para producir elevaciones robustas en umbrales en las ratas tratadas con nicotina pero no las tratadas con vehículo después de la retirada brusca de las minibombas (i.e. abstinencia espontánea) o la administración de antagonistas del receptor de la nicotina (i.e. abstinencia precipitada) (Malin et al., 1992, Pharmacol Biochem Behav 43:779-784; Malin et al., 1994, Psychopharmacology 115:180-184; Hildebrand et al., 1997, Psychopharmacology 129:348-356; Hildebrand et al., 1999, Neuropsychopharmacology 21: 560-574; Epping-Jordan et al., 1998, Nature 393:76-79; Watkins et al., 2000, J Pharmacol Exp Ther 292:1053-1064). Grupos separados de las ratas tratadas con nicotina y su correspondiente grupo control sin tratamiento previo con la nicotina, luego fueron inyectados por vía peritoneal con el agonista del receptor de mGlu1 LY314582 (0, 2.5, 0.5, 7.5 mg/kg; $n=9$ nicotina, $n=11$ control), el agonista del receptor de GABA_B CGP44532 (0, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5 mg/kg; $n=5$ nicotina, $n=5$ control), el antagonista del receptor mGlu5 MPEP (0, 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg; $n=8$ nicotina, $n=7$ vehículo o 0, 0.5, 1, 2, 3 mg/kg; $n=13$ nicotina, $n=13$ vehículo), el antagonista del receptor de NMDA MK-801 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.175, 0.2 mg/kg; $n=10$ nicotina, $n=9$ control) o el

antagonista del receptor AMPA/Kainato NBQX (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 mg/kg; $n=10$ nicotina, $n=12$ control) de acuerdo con un diseño intra-sujetos de cuadrado Latino y los umbrales de ICSS se evaluaron 30 min después. Un mínimo de 48 h se dejaron entre cada inyección en el diseño de cuadrado Latino, durante el cual los umbrales de ICSS continuaron siendo medidos, para asegurar que los umbrales de ICSS regresan al valor basal. Las dosis de LY314582 y MPEP fueron elegidas basándose en un estudio previo demostrando que ≥ 10 mg/kg de LY314582 y ≥ 3 mg/kg de MPEP elevaron los umbrales de ICSS en las ratas sin tratamiento previo con el fármaco (Harrison et al., 2002, *Psychopharmacology* 160:56-66). Las dosis de CGP44532 fueron elegidas basándose en un estudio previo que demuestra que ≥ 0.25 mg/kg elevó los umbrales de ICSS en las ratas sin tratamiento previo con el fármaco (Macey et al., 2001, *Neuropharmacology* 40: 676-685). Para la demostración potencial de los efectos de la interacción fue importante incluir dosis de las drogas de prueba que no alteraron los umbrales bajo condiciones basales.

Experimento de LY314582 en el área tegmental intra-ventral.

Después de que se logró una respuesta estable del ICSS basal ($\leq 10\%$ de variación en umbral durante 3 días consecutivos), las ratas ($n=15$) con cánulas bilaterales dirigidas hacia el VTA fueron asignadas a dos grupos de tal manera que no hubo diferencias en la media de los umbrales de recompensa basales o el peso corporal entre los grupos. A continuación, un grupo fue preparado con mini-bombas osmóticas subcutáneas que administran el vehículo y el segundo grupo con mini-bombas que administran la nicotina (3.16 mg/kg/días base libre de nicotina). Una vez más los animales se pusieron a prueba en el paradigma de ICSS cada día durante siete días antes del tratamiento con el fármaco. Ambos grupos de ratas luego fueron inyectados directamente en el VTA, como se describe anteriormente, con LY314582 (0, 10, 50 y 100 ng/lado; $n=7$ nicotina, $n=8$ control) de acuerdo con un diseño intra-sujetos de cuadrado Latino, y los umbrales de recompensa de ICSS fueron evaluados inmediatamente después de la inyección. Hubo un intervalo mínimo de 48 h entre cada inyección, durante el cual los umbrales de ICSS continuaron siendo medidos, para permitir que los umbrales regresen a los niveles basales antes de otros ensayos con las drogas. En la conclusión del experimento, todos los animales fueron anestesiados y sus cerebros retirados y se colocaron inmediatamente en hielo. Los cerebros se cortaron en secciones de 50 μm , y las colocaciones de los inyectores y los electrodos fueron examinados (ver Fig. 1 para la verificación histológica de los sitios de inyección). Solo aquellas ratas con puntas de inyección localizadas dentro del VTA fueron incluidas en los análisis estadísticos.

Experimento de abstinencia espontánea de la nicotina.

Las mini-bombas osmóticas fueron retiradas quirúrgicamente de las ratas tratadas con nicotina ($n=15$) (definidas como ratas que han sido preparadas con mini-bombas que administran 3.16 mg/kg/día de base libre de nicotina, durante al menos siete días) o las correspondientes ratas control ($n=17$; ratas preparadas con mini-bombas que contienen vehículo). A continuación todas las ratas fueron evaluadas en el procedimiento de ICSS a 12, 18, 24, 36, 48 y 72 hr después de la retirada de las mini-bombas osmóticas. Estos puntos de tiempo fueron elegidos basándose en la evolución temporal de las elevaciones del umbral observadas previamente durante la abstinencia espontánea de la nicotina después de la retirada de mini-bombas osmóticas que administran la nicotina (Harrison et al., 2001, *Neuropsychopharmacology* 25:55-71; K.L.). Basándose en los umbrales de recompensa de ICSS obtenidos en el punto de tiempo de 12 h, las ratas con abstinencia de nicotina fueron asignadas a dos grupos de tal manera que no hubo diferencia en la magnitud de las elevaciones del umbral de recompensa entre cada grupo ($117.67 \pm 3.1\%$, $n=8$; $119.93 \pm 3.5\%$, $n=7$). De manera similar, las ratas control fueron asignadas a dos grupos de tal manera que no hubo diferencia en la media de los umbrales de recompensa entre estos grupos ($106.45 \pm 5.2\%$, $n=7$; $103.63 \pm 3.6\%$, $n=10$). Treinta min antes de ser evaluados en el punto de tiempo de 18 h, un grupo de ratas con abstinencia de la nicotina y un grupo de ratas control fueron inyectadas con LY31495 (1 mg/kg); las ratas restantes fueron inyectadas con vehículo.

Análisis estadísticos

Para todos los experimentos, excepto para el experimento de abstinencia espontánea de la nicotina, la variación de porcentaje del umbral de recompensa basal se calculó por la expresión de las puntuaciones del umbral influenciadas por el fármaco como un porcentaje del umbral de días previos (i.e. un umbral basal libre de droga). Estos porcentajes de las puntuaciones basales fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas de dos factores, con tratamiento de dosis del fármaco como el factor intra-sujetos y contenido de la bomba (nicotina o control) como el factor entre-sujetos. Para el experimento de abstinencia espontánea de la nicotina, la variación del porcentaje a partir del umbral de recompensa basal se calculó, mediante la expresión de las puntuaciones del umbral obtenidas en cada punto de tiempo durante la abstinencia como un porcentaje de umbrales para cada rata en los días inmediatamente antes de la retirada de la mini-bomba. Estos porcentajes de las puntuaciones basales fueron sometidas a un ANOVA con medidas repetidas de tres factores. El factor entre-sujetos fue el tiempo después de la retirada de la mini-bomba, y los dos factores entre-sujetos fueron el contenido de la bomba (nicotina o vehículo) y tratamiento agudo con el fármaco (LY314582 o vehículo). Para todos los experimentos, los datos de latencia de respuesta fueron analizados de la misma manera que los datos de umbral. Después los efectos estadísticamente significantes en los ANOVAs, las comparaciones *post-hoc* entre las medias fueron conducidas con el test de Fisher LSD.

Resultados

La administración intraperitoneal del agonista del receptor de mGlu1 LY314582 (2.5-7.5 mg/kg) elevó los umbrales de recompensa de ICSS en las ratas tratadas con nicotina pero no en las ratas control. Este efecto se reflejó en un efecto estadísticamente significativo del grupo ($F_{(1,18)}=7.43$, $p<0.05$), un efecto significativo de dosis ($F_{(3,54)}=5.02$, $p<0.005$), y una interacción significativa grupo x dosis ($F_{(3,54)}=2.79$, $p<0.05$). El análisis *post-hoc* reveló que la dosis más alta de LY314582 (7.5 mg/kg) elevó los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina en comparación con el tratamiento con vehículo ($p<0.01$), y en comparación con la ratas control evaluadas con la misma dosis ($p<0.01$) (Fig. 2A). En contraste con sus efectos en los umbrales de recompensa, LY314582 no tuvo efecto en las latencias de respuesta en las ratas tratadas con nicotina o ratas control ($F_{(3,54)}=0.59$, NS) en cualquier dosis evaluada (Fig. 2B).

Como se muestra en la Tabla 1, el agonista del receptor de GABA_B selectivo, CGP44532 no precipitó las elevaciones del umbral de recompensa en las ratas tratadas con nicotina a las dosis evaluadas más bajas (0.065-0.25 mg/kg), mientras que en las dosis más altas evaluadas, CGP44532 (0.5 mg/kg) elevó los umbrales de recompensa en las ratas control y las tratadas con nicotina ($F_{(4,32)}=16.62$, $p<0.001$). No hubo diferencia en los efectos de CGP44532 en las ratas tratadas con nicotina en comparación con las ratas control (interacción grupo x dosis: $F_{(4,32)}=0.05$, NS). CGP44532 tampoco tuvo efecto en las latencias de respuesta a cualquier dosis evaluada ($F_{(4,32)}=0.30$, NS).

Tabla 1. Efectos del agonista del receptor de GABA_B CGP44532 sobre los umbrales de ICSS y las latencias de respuesta en las ratas tratadas con nicotina y con vehículo

CGP44532 (mg/kg)	Vehículo		Nicotina	
	Umbrales	Latencias	Umbrales	Latencias
	n=5		n=5	
0	96.79 ± 2.8	95.51 ± 2.2	99.93 ± 4.1	100.31 ± 4.6
0.065	96.28 ± 3.1	97.31 ± 3.8	96.37 ± 3.2	106.02 ± 8.1
0.125	106.76 ± 3.2	102.34 ± 2.8	103.88 ± 7.2	98.15 ± 5.3
0.25	109.14 ± 5.1	105.03 ± 3.1	109.98 ± 5.4	99.05 ± 3.1
0.5	148.43 ± 16.6***	106.13 ± 6.5	146.83 ± 14.3***	98.11 ± 5.4

Los datos (media ± SEM) se expresan como el porcentaje de umbral de ICSS basal y la latencia de respuesta. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significantes entre el tratamiento con vehículo y con CGP44532. *** $P<0.001$ después del ANOVA de dos vías significativo con medidas repetidas.

Como se muestra en la Figura 3, la microinfusión bilateral de LY314582 (10-100 ng/lado) directamente en el VTA elevó significativamente los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina pero no en las ratas control. Una vez más hubo efectos significantes del grupo ($F_{(1,13)}=4.81$, $p<0.05$), dosis ($F_{(3,39)}=4.77$, $p<0.01$), y una interacción significativa grupo x dosis ($F_{(3,39)}=3.82$, $p<0.05$). Los análisis *post-hoc* revelaron que las dosis de 50 y 100 ng/lado de LY314582 fueron suficientes para elevar los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina sin afectar los umbrales en las ratas control. LY314582 no tuvo efecto en las latencias de respuesta ($F_{(3,39)}=1.94$, NS) en las ratas tratadas con nicotina o las ratas control después de la administración de VTA (Fig. 3B).

Como se muestra en la Figura 4, la abstinencia de tratamiento crónico con nicotina produjo elevaciones robustas del umbral de ICSS en comparación con las ratas control ($F_{(1,27)}=15.3$, $p=0.0006$). Los análisis de la interacción significativa grupo x dosis x tiempo ($F_{(5,135)}=3.3$, $p=0.01$) revelaron lo siguiente: Las ratas tratadas con nicotina inyectadas con vehículo demostraron elevaciones robustas del umbral de recompensa que alcanzaron un máximo de 24 h después de la retirada de la mini-bomba (Fig. 4A). Sin embargo, la administración de LY31495 30 min antes del punto de tiempo de 18 h atenúa significativamente las elevaciones en los umbrales de recompensa en las ratas con abstinencia de nicotina ($p<0.001$) (ver Fig. 4A), sin afectar los umbrales en las ratas control (Fig. 4B). LY31495 no tuvo efecto en las latencias de respuesta en ningún punto de tiempo después de la inyección ($F_{(1,27)}=0.43$, NS).

Como se ilustra en la Tabla 2, MK-801 (disciplina) (0.01-0.2 mg/kg) redujo los umbrales de recompensa en las ratas control y las tratadas con nicotina ($F_{(6,66)}=7.5$, $p<0.0001$).

Tabla 2. Efectos del antagonista del receptor de NMDA MK-801 sobre los umbrales de ICSS y las latencias de respuesta en las ratas tratadas con nicotina y con vehículo

MK-801 (mg/kg)	Vehículo		Nicotina	
	Umbrales	Latencias	Umbrales	Latencias
	n=9		n=10	
0	102.72 ± 3.9	99.04 ± 1.7	103.65 ± 1.7	93.73 ± 2.7
0.01	95.99 ± 3.3	100.00 ± 2.5	98.20 ± 6.1	95.41 ± 2.3
0.03	92.54 ± 2.6	103.14 ± 2.1	93.09 ± 3.9	94.64 ± 3.6
0.1	88.48 ± 5.6**	98.97 ± 3.9	89.42 ± 3.6	106.14 ± 4.4
0.15	87.14 ± 4.6**	101.60 ± 2.0	76.24 ± 4.7***	93.65 ± 3.6
0.175	93.64 ± 3.4*	119.22 ± 11.9**	82.26 ± 3.7**	93.56 ± 4.2
0.2	82.47 ± 4.3***	119.21 ± 9.4**	84.29 ± 3.0*	105.14 ± 1.9

Los datos (media ± SEM) se expresan como el porcentaje del umbral de ICSS basal y la latencia de respuesta. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significantes entre el tratamiento con MK-801 y con vehículo. * $P<0.05$. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ después del ANOVA de dos vías significativa con medidas repetidas.

5 MK-801 redujo los umbrales de recompensa por una magnitud similar en las ratas control y las tratadas con nicotina y no hubo interacción grupo x dosis ($F_{(6,66)}=1.2$, NS). Las dosis de MK-801 ≥ 0.2 mg/kg causaron discontinuidad en el rendimiento en el paradigma de ICSS en ambos grupos, de tal manera que las ratas ya no respondieron más a la auto-estimulación, y por consiguiente las dosis superiores de 0.2 mg/kg no fueron evaluadas. Adicionalmente, MK-801 no precipitó las elevaciones similares a la abstinencia en los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina en cualquier dosis evaluada. MK-801 aumentó significativamente las latencias de respuesta ($F_{(6,72)}=2.9$, $p<0.05$). El análisis *post-hoc* demostró que a medida que la dosis de MK-801 aumentó, también lo hizo la latencia de respuesta, particularmente en las ratas control, lo que sugiere que el rendimiento se afectó cada vez más a dosis más altas de MK-801.

15 Como se muestra en la Tabla 3, las dosis bajas de MPEP (0.01-0.1 mg/kg) no afectaron los umbrales de recompensa ($F_{(3,39)}=2.3$, NS) o las latencias de respuesta ($F_{(3,39)}=0.4$, NS) en las ratas tratadas con nicotina o las ratas control. Las dosis más altas de MPEP (0.5-3 mg/kg) elevaron los umbrales de recompensa en las ratas control y las tratadas con nicotina ($F_{(4,96)}=8.4$, $P<0.0001$). Sin embargo, MPEP elevó los umbrales de ICSS en ambos grupos de ratas por una magnitud similar, y no hubo interacción grupo x dosis ($F_{(4,96)}=0.7$, NS). MPEP (0.5-3 mg/kg) no tuvo efecto en las latencias de respuesta ($F_{(4,96)}=1.4$, NS) en ningún grupo.

Tabla 3. Efectos del antagonista del receptor mGlu5 MPEP en los umbrales de ICSS y las latencias de respuesta en las ratas tratadas con nicotina y con vehículo

MPEP (mg/kg)	Vehículo		Nicotina	
	Umbrales	Latencias	Umbrales	Latencias
	n=7		n=8	
0	97.67 ± 2.0	104.78 ± 1.1	95.68 ± 3.5	101.79 ± 5.2
0.01	98.75 ± 3.5	99.75 ± 3.4	93.86 ± 6.0	101.50 ± 2.2

(continuación)

Tabla 3. Efectos del antagonista del receptor mGlu5 MPEP en los umbrales de ICSS y las latencias de respuesta en las ratas tratadas con nicotina y con vehículo

MPEP (mg/kg)	Vehículo		Nicotina	
	Umbrales	Latencias	Umbrales	Latencias
	<i>n</i> =7		<i>n</i> =8	
0.05	101.27 ± 4.1	104.87 ± 3.3	94.11 ± 2.6	103.48 ± 4.2
0.1	105.13 ± 3.2	105.13 ± 4.8	103.84 ± 1.2	102.54 ± 1.5
	<i>n</i> =13		<i>n</i> =13	
0	99.91 ± 1.8	99.41 ± 1.9	100.62 ± 3.3	100.76 ± 2.3
0.5	103.01 ± 2.7	103.20 ± 4.4	104.02 ± 2.2	99.47 ± 1.9
1	103.70 ± 3.0	100.72 ± 2.1	105.81 ± 3.3	99.12 ± 1.7
2	111.21 ± 2.3**	107.60 ± 2.6	121.17 ± 6.2**	101.31 ± 2.2
3	111.52 ± 4.8**	103.58 ± 2.3	119.11 ± 5.5**	102.22 ± 3.6

Los datos (media ± SEM) se expresan como el porcentaje de umbral de ICSS basal y la latencia de respuesta. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significantes entre el tratamiento con MPEP y con vehículo. **P<0.01 después del ANOVA de dos vías significantes con medidas repetidas.

5 Como se ilustra en la Figura 5, el antagonista del receptor AMPA/Kainato NBQX (0.01-1 mg/kg) alteró significativamente los umbrales de recompensa de ICSS en las ratas tratadas con nicotina pero no en las ratas control. Este efecto se reflejó en un efecto estadísticamente significativo de grupo ($F_{(1,20)}=1.082$, $p<0.005$), un efecto significativo de dosis ($F_{(7,140)}=2.8$, $p<0.01$), y una interacción significativa grupo x dosis ($F_{(7,140)}=2.11$, $p<0.05$). El análisis *post-hoc* reveló una acción bimodal de NBQX en los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina. Las dosis bajas de NBQX (0.025-0.1 mg/kg) elevaron los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina, mientras que dosis más altas de NBQX (0.5-1 mg/kg) fueron menos efectivas y no aumentaron significativamente los umbrales en comparación con el tratamiento con vehículo (Fig. 5A). NBQX no tuvo efecto en las latencias de respuesta en las ratas tratadas con nicotina o las ratas control en cualquier dosis evaluada ($F_{(7,140)}=0.31$, NS) (Fig. 5B).

15 Los datos actuales proporcionan una fuerte evidencia de un papel del receptor metabotrópico de glutamato del grupo II, en la regulación del déficit en función de la recompensa del cerebro asociada con la abstinencia de la nicotina, mientras que se demuestra que la activación de los receptores mGlu1 precipitó el déficit de recompensa en las ratas tratadas con nicotina similar al observado durante la abstinencia de la nicotina. Adicionalmente, la activación de los receptores mGlu1 localizados dentro del VTA también precipitó el déficit similar a la abstinencia de recompensa en las ratas tratadas con nicotina, proporcionando otra evidencia de un importante papel del VTA en la mediación de las acciones de nicotina sobre la vía de recompensa del cerebro (Hildebrand et al., 1999; Mansvelder and McGehee, 2000; Mansvelder et al., 2002). Por último, el bloqueo de los receptores mGlu1 atenúa el déficit en función de la recompensa del cerebro observado en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina. Previamente, se demostró que el agonista del receptor de mGlu1 LY354740 atenúa el aumento de sobresalto auditivo observado durante la abstinencia espontánea de la nicotina (Helton et al., 1997). Una posible explicación para estas observaciones es que los receptores mGlu1 localizados en diferentes sitios del cerebro pueden regular diferencialmente varios aspectos de la abstinencia de la nicotina.

Discusión

30 La administración sistémica del agonista selectivo del receptor de mGlu1, LY314582 (2.5-7.5 mg/kg), pero no el agonista del receptor de GABA_B, CGP44532 (0.065-0.5 mg/kg), precipitó las elevaciones similares a la abstinencia en los umbrales de recompensa de auto estimulación intracerebral (ICSS), una medida sensible de la función de

recompensa, en las ratas dependientes de la nicotina, pero no en las ratas control. LY314582 no afectó las latencias de respuesta, una medida del rendimiento en el paradigma de ICSS. La microinfusión bilateral de LY314582 (10-100 ng/lado) en el área ventral tegmental (VTA) igualmente precipitó las elevaciones del umbral en ratas dependientes de la nicotina pero no en ratas control. Adicionalmente, una única inyección del antagonista del receptor de mGlu1 LY341495 (1 mg/kg) atenúa las elevaciones en los umbrales de recompensa en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina. Por último, debido a la activación de los receptores mglu1 disminuye la transmisión del glutamato, se planteó la hipótesis que el bloqueo de los receptores de glutamato postsinápticos también debería precipitar el déficit de recompensa similar a la abstinencia en las ratas dependientes de la nicotina. En consecuencia, NBQX (0.001-1 mg/kg), un antagonista selectivo del receptor AMPA/Kainato (α -amino-3- hidroxí - 5-metil-4-isoxazol propionato/kainato), precipitó las elevaciones similares a la abstinencia en los umbrales de ICSS en ratas dependientes de la nicotina pero no en ratas control, mientras que MPEP (0.01-3 mg/kg) y MK-801 (0.01-0.125 mg/kg), antagonistas de los receptores mGlu5 (metabotrópico glutamato 5) y NMDA (N-metil-D-aspartato) respectivamente, no. En general, estos datos demuestran que la regulación inhibitoria de la función de recompensa del cerebro por los receptores mGlu1 localizados en el VTA se incrementó en las ratas dependientes a la nicotina, lo que contribuyó al déficit de recompensa asociado con la abstinencia de la nicotina. Adicionalmente, es probable que la disminución de la transmisión del glutamato en los receptores AMPA/Kainato también contribuyó a los déficits de recompensa inducidos por la abstinencia de la nicotina.

Ahora hay evidencias convincentes de que el síndrome de aversión observado durante periodos de abstinencia de nicotina contribuye a la adicción del tabaco (Kenny and Markou, 2001, *Pharmacol Biochem Behav* 70:531-549). De hecho, se demostró recientemente que la abstinencia de la nicotina precipita un déficit en la función de recompensa del cerebro, según se mide mediante las elevaciones en los umbrales de recompensa de auto estimulación intracerebral (ICSS), similares en magnitud y duración a aquellas observadas en las ratas que experimentan la abstinencia de otras principales drogas de abuso (Epping-Jordan et al., 1998 *Nature* 393:76-79; Harrison et al., 2001 *Neuropsychopharmacology* 25:55-71). Además, este déficit en función de la recompensa del cerebro se ha propuesto como un factor de motivación importante que contribuye al deseo, recaída y consumo de tabaco continuado en fumadores humanos (Epping-Jordan et al., 1998). Sin embargo, en contraste con la profunda investigación en los mecanismos por los cuales la nicotina produce sus efectos de recompensa (ver Picciotto and Corrigall, 2002 *J Neurosci* 22:3338-3341), poco se conoce en relación con los mecanismos implicados en el déficit de recompensa asociado con la abstinencia de la nicotina.

Una característica común de fármacos de abuso, incluyendo la nicotina es su capacidad para incrementar la transmisión de dopamina en la vía de recompensa mesoaccumbens y para facilitar así la función de recompensa del cerebro (Pontieri et al., 1996; Picciotto, 1998; Di Chiara, 2000). Se piensa que la nicotina logra esto, en parte, mediante la activación de la transmisión del glutamato de excitación en el VTA (Schilström et al., 1998; Mansvelder and McGehee, 2000; Mansvelder et al., 2002). Por lo tanto, debido a que los receptores mGlu1 localizados en el VTA son autoreceptores presinápticos que disminuyen la transmisión del glutamato (Bonci et al., 1997; Wigmore and Lacey, 1998; Manzoni and Williams, 1999), es probable que aumente la sensibilidad de los receptores mGlu1 localizados en el VTA en las ratas tratadas con nicotina ocurre en respuesta a un patrón de activación prolongada de la transmisión del glutamato de excitación por la nicotina en este sitio del cerebro.

Durante la abstinencia de la nicotina, cuando los efectos estimulantes de la nicotina en la transmisión del glutamato de excitación ya no estaban presentes, se debería esperar que el aumento de la función del receptor en el VTA disminuyera la transmisión del glutamato y disminuyera así la actividad del sistema de recompensa del cerebro. Los estudios electrofisiológicos y la microdiálisis *in vivo* son consistentes con esta hipótesis. Por ejemplo, Manzoni and Williams (1999) demostraron que el tratamiento prolongado con opiáceos aumentó los efectos inhibitorios del agonista del receptor de mGlu1 sobre corrientes de glutamato excitativas en las neuronas de dopamina de VTA. De manera similar, el tratamiento repetido con cocaína aumentó el contenido y la dimerización de los receptores mGlu1 en el NAcc, y aumentando así los efectos inhibitorios de los receptores mGlu1 en el flujo del glutamato en este sitio del cerebro (Xi et al., 2001). Es interesante registrar que estudios similares también documentaron un aumento en la función del receptor GABA_B en el VTA después del tratamiento repetido con opiáceos y anfetaminas (Manzoni and Williams, 1999; Giorgetti et al., 2002). Sin embargo, encontramos que la regulación de la función de recompensa del cerebro por los receptores GABA_B fue igual en las ratas tratadas con nicotina en comparación con los controles, lo que sugiere que los receptores GABA_B probablemente no se involucran en la mediación del déficit de recompensa asociado con la abstinencia de la nicotina.

Estudios previos han encontrado que el agonista del receptor de mGlu1 LY354740 mejoró el aumento de la respuesta de sobresalto auditivo en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina (Helton et al., 1997). De manera similar, los agonistas en los receptores mGlu1 disminuyeron los signos físicos de abstinencia en las ratas que experimentan abstinencia de los opiáceos (Fundytus and Coderre, 1997; Vandergriff and Rasmussen, 1999). Estas observaciones pueden parecer en desacuerdo con los datos presentados en este documento en el cual la administración sistémica e intra-VTA de un agonista selectivo del receptor de mGlu1 precipitó el déficit de recompensa similar a la abstinencia en las ratas tratadas con nicotina y el bloqueo de estos receptores invierte la abstinencia espontánea de la nicotina.

Sin embargo, se acumula la evidencia de un papel diferencial de la transmisión del glutamato en varios aspectos de abstinencia a las drogas. Por ejemplo, se piensa que el incremento de la transmisión del glutamato, particularmente en el locus coeruleus (LC) y la amígdala (Zhang et al., 1994; Rasmussen, 1995; Taylor et al., 1997), juega un papel importante en la expresión de los aspectos "somáticos" del síndrome de abstinencia de los opiáceos, mientras que se piensa que la disminución de la transmisión del glutamato en el sistema de recompensa mesoaccumbens, contribuye a los déficits de recompensa y de motivación manifestados durante la abstinencia de opiáceos y otras drogas de abuso (Keys et al., 1998; Lu and Wolf, 1999; Manzoni and Williams, 1999; Giorgetti et al., 2002). De hecho, recientemente Shaw-Lutchman and colleagues (2002) demostraron que la transcripción mediada del elemento de respuesta cAMP (CRE), un marcador de la actividad celular, se incrementaron en el LC y la amígdala y disminuyeron en el VTA en las ratas que experimentan abstinencia de morfina precipitada, lo que sugiere que la actividad de este sitio se alteró en direcciones opuestas durante la abstinencia de la morfina. Basándose en estas observaciones, es probable que también exista una disociación similar para el papel de glutamato en la mediación de diferentes aspectos de la abstinencia de la nicotina. Sin embargo, vale la pena señalar que los aspectos afectivos de abstinencia a las drogas, y en particular el déficit en función de recompensa del cerebro, se consideran más importantes en el mantenimiento de dependencia a las drogas en comparación con los otros síntomas de abstinencia a las drogas (Markou et al., 1998; Kenny and Markou, 2001; Ahmed et al., 2002).

La transmisión del glutamato regula la excitabilidad de neuronas de dopamina en el mesoaccumbens, y juega un papel esencial en la mediación de la actividad basal de rutas de recompensa (Kalivas and Stewart, 1991; Suaud-Chagny et al., 1992; Kalivas, 1993). Como se describe anteriormente, los receptores mGlu1 actúan como autoreceptores presinápticos en el VTA donde deprimen la transmisión del glutamato. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que los receptores mGlu1 elevaron los umbrales de recompensa en las ratas con abstinencia de nicotina, al menos en parte, disminuyendo la transmisión del glutamato y que el bloqueo de la transmisión del glutamato en los receptores del glutamato postsinápticos precipitarían las elevaciones del umbral de recompensa en las ratas tratadas con nicotina similares a aquellas en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina.

En consecuencia, a las dosis bajas el antagonista del receptor AMPA/Kainato NBQX precipitó las elevaciones en los umbrales de recompensa en las ratas tratadas con nicotina pero no en las ratas control. Esta observación sugiere que la disminución de la transmisión del glutamato en los receptores de AMPA/Kainato contribuye al déficit de recompensa asociado con la abstinencia de la nicotina. Estos datos también son consistentes con los hallazgos recientes que demuestran que el tratamiento prolongado con nicotina disminuyó la inmunoreactividad del receptor AMPA en el NAcc y VTA (Lee et al., 2001). Bajo condiciones normales, los receptores AMPA/Kainato son los reguladores primarios de la transmisión del glutamato de excitación en toda la ruta de recompensa del mesoaccumbens (Pennartz et al., 1990; Hu and White, 1996). Por lo tanto, similar a un aumento en la función del receptor, disminuyó la expresión del receptor AMPA en las ratas tratadas con nicotina se debería esperar que disminuyera la transmisión de dopamina en el mesoaccumbens y por lo tanto actúa para contrarrestar los prolongados efectos estimulantes de la nicotina en este sistema.

Curiosamente, el bloqueo de los receptores NMDA en las ratas tratadas con nicotina, no precipitó las elevaciones del umbral de recompensa, pero en su lugar redujo los umbrales, reflejando una acción de recompensa en ambas ratas control y tratadas con nicotina. Existe considerable evidencia de que los receptores NMDA juegan un papel crucial en la mediación de los efectos estimulantes de nicotina en la transmisión de dopamina en el mesoaccumbens (Schilström et al., 1998; Fu et al., 2000; Mansvelder and McGehee, 2000). Por lo tanto, se podría haber esperado que mediante el bloqueo de los efectos estimulantes de la nicotina sobre las rutas de recompensa antagonizando los receptores NMDA, los procesos contra-adaptativos que ocurren durante el tratamiento prolongado con nicotina, tal como aumento la sensibilidad de los receptores mGlu1, habría dado lugar a elevaciones en los umbrales de ICSS.

Una explicación para estos datos es que muchas poblaciones de los receptores NMDA existen en todos los circuitos de recompensa del cerebro, potencialmente con acciones opuestas en la función de recompensa del cerebro. De hecho, los antagonistas de los receptores NMDA son por si mismos recompensa y se ha demostrado que bajan los umbrales de ICSS después de la administración intra-VTA directa (David et al., 1998). El bloqueo de los receptores mGlu5 tampoco precipita la abstinencia de la nicotina, pero en su lugar elevó los umbrales de ICSS en ratas control y tratadas con nicotina. Estos datos demuestran que el bloqueo del receptor mGlu5 disminuye la función de recompensa del cerebro a un grado similar en ambos grupos de ratas.

Ejemplo 2

El antagonista de mGluR5 mep disminuye la auto-administración de la nicotina en ratas y ratones

Este ejemplo ilustra que el bloqueo de mGluR5 disminuye la auto-administración de la nicotina tanto en ratas como en ratones, y son consistentes con los hallazgos que muestran un papel de mGluR5 en la auto-administración de cocaína. Se piensa que la auto-administración de la nicotina por las ratas refleja los efectos de recompensa de nicotina, y se ha demostrado que es sensible a la modulación de neurotransmisión dopaminérgica (Corrigall & Coen 1991; Picciotto and Corrigall 2002), colinérgica (Watkins et al. 1999; Corrigall et al. 2002; Picciotto and Corrigall

2002) y ácido K-amino-butírico (GABA)-érgica (Dewey et al. 1999; Paterson and Markou 2002; Picciotto and Corrigan 2002). Un trabajo adicional ha sugerido un posible papel del glutamato en la mediación de los efectos de recompensa de la nicotina (McGehee et al. 1995; Schilstrom et al. 2000; Reid et al. 2000). Específicamente, los estudios neuroquímicos indicaron que la administración sistémica de la nicotina dio lugar a aumentos significantes en los niveles de glutamato en el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (NAcc) (Reid et al. 2000; Schilstrom et al. 2000). Adicionalmente, un reciente estudio electrofisiológico por Mansvelder and colleagues (2002) indicó una interacción compleja entre las entradas GABA-érgica y glutamatérgica a las neuronas de dopamina del cerebro medio en el nivel del VTA en tajadas expuestas a niveles de nicotina de duración y concentraciones similares a las experimentadas en cerebros de fumadores. En resumen, se piensa que la nicotina ejerce sus efectos de recompensa por interacciones complejas de neurotransmisores múltiples en el sistema nervioso central. El principal de ellos es el sistema dopaminérgico mesolímbico, aunque recientemente también se ha demostrado que juega un papel importante.

Los ocho subtipos del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) se dividen en tres grupos, basándose en la homología de la secuencia de aminoácido, los segundos sistemas mensajeros y la farmacología (Conn and Pin 1997). Los mGluRs del Grupo I comprenden el receptor metabotrópico de glutamato subtipo 5 (mGluR5) y mGluR1, y actúan vía estimulación de fosfolipasa C (Conn and Pin 1997). La distribución de mGluR5s se ha caracterizado con detalle, indicando la distribución pesada en el NAcc, el cuerpo estriado y el hipocampo en el cerebro de rata (Shigemoto et al. 1993; Tallakssen-Greene et al. 1998). Se ha demostrado que los receptores metabotrópicos de glutamato se involucran en la modulación de liberación de neurotransmisores (Cartmell and Schoepp 2000; Schoepp 2001), la plasticidad sináptica y el aprendizaje (Holscher et al. 2001), la neuroprotección (Battaglia et al. 2001, 2002), los comportamientos locomotores dependientes de la dopamina (para la revisión, ver Vezina and Kim 1999) y el dolor (para la revisión, ver Spooren et al. 2001).

Recientemente, y más relevante al presente estudio, se ha demostrado que los ratones carentes de mGluR5 no adquirirán auto-administración intravenosa de cocaína (Chiamulera et al. 2001). Además, la administración del antagonista específico de mGluR5 2-metil-6-(feniletinil)-piridina (MPEP; Gasparini et al. 1999) dio lugar a una reducción dependiente de la dosis en la auto-administración de cocaína sin afectar la respuesta para el alimento (Chiamulera et al. 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que la administración repetida de la cocaína durante una semana dio lugar a un aumento significativo de los niveles de expresión de ARNm de mGluR5 en el almacén del núcleo accumbens y que el cuerpo estriado dorsal persistió por tres semanas después del cese de la administración de la cocaína (Ghasemzadeh et al. 1999). Además de la auto-administración de cocaína, se ha demostrado que MPEP tiene varios efectos en una variedad de paradigmas del comportamiento en animales de laboratorio. Un trabajo previo indicó que la administración de MPEP en roedores tiene importantes efectos como ansiolíticos y antidepresivos (Spooren et al. 2000b; Tatarczynska et al. 2001). Además, se demostró que MPEP bloquea el condicionamiento del miedo (Schulz et al. 2001), ejerce efectos como anti-parkinson (Ossowska et al. 2001; Breyse et al. 2002), y tienen actividad anticonvulsiva (Chapman et al. 2000) en roedores. En resumen, se ha demostrado que MPEP tiene una amplia variedad de efectos en un número de diferentes paradigmas del comportamiento en roedores, y se ha demostrado que el mGluR5 se involucra en la auto-administración de la cocaína y posiblemente en los efectos a largo plazo de la cocaína.

Basándose en los hallazgos previos, resumidos anteriormente que indican un papel de los receptores mGluR5 en la mediación de los efectos de recompensa de cocaína (Chiamulera et al., 2001), y también el papel del glutamato en la mediación de los efectos de recompensa de nicotina, el estudio actual se propuso determinar los efectos de MPEP en los efectos de refuerzo de nicotina por vía intravenosa en las ratas que regularmente se auto administran nicotina en una de dos dosis (0.03 y 0.01 mg/kg/infusión), y en ratones sin tratamiento con el fármaco. Además, el efecto de la administración de MPEP en la respuesta continuada al alimento en las ratas se investigó para determinar la especificidad de los efectos de MPEP. Adicionalmente, el procedimiento de auto-administración del ratón utilizado en este documento incluye ratones control emparejados que permiten la evaluación de los efectos no-específicos de manipulaciones farmacológicas.

Materiales y Métodos

Sujetos

Ratas macho de la cepa Wistar (Charles River, Raleigh, NC) con un peso de 300-350 g al llegar al laboratorio fueron alojadas en grupo (dos por jaula) en un bioterio con temperatura y humedad controladas en un ciclo de luz-oscuridad inverso de 12 hr (luz a las 10 am) con acceso no-restringido al agua excepto durante el prueba, y alimento restringido a 20 g/día después de adquirir el comportamiento de auto-administración de la nicotina. Ratones machos de la cepa DBA/2J (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) con una edad de 10-12 semanas al llegar al laboratorio fueron alojados en grupo (4 por jaula) en un bioterio con temperatura y humedad controladas en un ciclo de luz-oscuridad inverso de 12 hr (luz a las 6 am) con acceso no-restringido al alimento y agua excepto durante la prueba. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron durante la fase de oscuridad del ciclo luz-oscuridad. Todos los sujetos se trataron, alojaron y utilizaron de acuerdo con the National Institutes of Health guidelines and the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC).

Drogas

(-) hidrógeno tartrato de nicotina fue adquirido de Sigma (St. Louis, MO), se disolvió en solución salina y el pH se ajustó a 7.0 (± 0.5) con hidróxido de sodio. A continuación, la solución se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.22 μm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA 15219) con fines de esterilización. Las dosis de nicotina se reportaron como concentraciones de base libre. MPEP fue donado amablemente por Novartis Pharma AG, se disolvió en 0.9% cloruro de sodio, y se administra por vía peritoneal en un volumen de 1 o 10 ml/kg con un tiempo de pretratamiento de 30 o 15 minutos en las ratas y ratones, respectivamente.

*Equipos**Cajas operantes de respuesta al alimento y a la auto-administración de la rata*

La respuesta continuada al alimento y la auto-administración por vía intravenosa de la nicotina, se llevaron a cabo en doce cámaras operantes de Plexiglas cada una alojada en una caja atenuada al sonido, como se describe previamente (Markou and Paterson 2001).

Cajas operantes de auto-administración de los ratones

Toda la auto-administración de la nicotina en los ratones se llevó a cabo en un equipo (San Diego Instruments, San Diego, CA) que consistió de cuatro jaulas de prueba idénticas (8 x 8 x 8 cm), que permiten una prueba simultánea de dos pares de ratones (ver Semenova et al. 1995, 1999; Kuzmin et al. 1996a, 1997). Las cajas fueron construidas de plástico de forma opaca y contenían dos aperturas: una para asomar la nariz, y una para fijar la cola. Todas las funciones de la sesión de prueba y los datos fueron controlados y registrados por un ordenador.

Respuesta continuada al alimento y auto-administración de la rata

Entrenamiento de alimento y adquisición de la auto-administración de la nicotina

Aproximadamente una semana después de la preparación con catéteres en la vena yugular (ver Markou and Paterson 2001), las ratas fueron entrenadas para auto-administrarse la nicotina (ver Markou and Paterson 2001) a dos dosis (0.01 [$n=9$] y 0.03 [$n=9$] mg/kg/inf; base libre) bajo una programación FR5 TO20 seg. Dos grupos adicionales de ratas se dejaron responder al alimento (45 mg de pellet de alimento Noyes) bajo una programación FR5 TO20 seg ($n=10$), y una FR5 TO210 seg ($n=10$). Las dos diferentes programaciones fueron empleadas para permitir la evaluación de los efectos de MPEP en la respuesta al alimento bajo una programación de refuerzo (FR5 TO20 seg) idéntica a la utilizada para la nicotina, y bajo una programación de refuerzo (FR5 T021 0) que iguala las proporciones de respuesta del alimento a las vistas en la nicotina. La respuesta en la palanca activa dio lugar a una administración de solución de nicotina en un volumen de 0.1 ml/infusión durante un periodo de 1 segundo (Razel Scientific Instruments Inc, Stamford, CT), mientras que la respuesta en la palanca inactiva no tuvo consecuencias. Se consideró que las ratas habían adquirido una respuesta operante estable cuando pulsaban la palanca activa más de dos veces que el número de veces que pulsaban la palanca inactiva, recibieron un mínimo de 6 infusiones o 90 pellets por sesión de 1 hora, con una variación inferior del 20% en el número de refuerzos obtenidos por sesión. Las ratas tomaron aproximadamente dos semanas para establecer tasas estables de respuesta operante. Todas las sesiones de la prueba fueron conducidas durante una hora por día, cinco días por semana.

Auto-administración por vía intravenosa en ratones

La auto-administración aguda de nicotina se llevó a cabo utilizando un método descrito previamente (Semenova et al. 1995, 1999; Kuzmin et al. 1996a, 1997). Las colas de los ratones se fijaron a la superficie del aparato durante las sesiones de la prueba para permitir la administración del fármaco; la fijación de la cola permitió a los ratones mover todas sus cuatro patas, la cabeza y el cuerpo entero. Las infusiones de droga o vehículo (1.6 μl /inf suministrados durante 1 segundo) se administraron a ambos ratones en una pareja, vía las venas de la cola laterales, dependiendo de cada vez que asoman la nariz de un animal por pareja (el ratón activo). Solamente la señal asociada con la administración de la infusión del fármaco o el vehículo fue el ruido de la bomba. Los ratones fueron probados una vez o dos veces, con aproximadamente un mes entre cada prueba. La segunda prueba solo ocurre en un subconjunto del conjunto original de ratones (2-7 parejas de ratones de cada uno de los grupos originales). Esto se hizo para aumentar el número de sujetos/condición, e involucró la asignación y prueba aleatoria de estos ratones bajo un conjunto de condiciones diferentes que en la prueba original (i.e., diferentes dosis de nicotina y/o MPEP). Teniendo en cuenta el intervalo entre las dos pruebas para un subconjunto limitado de los ratones, es muy poco probable que pruebas repetidas afectaran los resultados.

Procedimientos Experimentales

Experimento 1: Efecto de la administración de MPEP sobre las tasas de respuesta continuada de alimento y auto-administración de la nicotina en una programación de proporción fija de refuerzo en las ratas

5 Después de adquirir la auto-administración estable de la nicotina a ya sea 0.01 mg/kg/infusión ($n=9$) o 0.03 mg/kg/infusión ($n=9$), o respuesta estable continuada al alimento en la programación FR5 TO 20 seg ($n=10$) o la programación FR5 T021 0 seg ($n=10$), la prueba del fármaco se inició. MPEP (0, 1, 3 y 9 mg/kg) se administró por vía peritoneal 30 minutos antes de la sesión, de acuerdo con un diseño en cuadrado Latino, con al menos seis días transcurridos entre cada dosis de prueba. El fármaco solo se administró cuando los animales han demostrado el comportamiento de auto-administración estable durante los últimos 3 días, definidos como una variación inferior del 20% en el rendimiento diario.

10 Experimento 2: Efecto de la administración de MPEP en la auto-administración de la nicotina en ratones sin tratamiento con el fármaco

15 La solución salina o una de las cuatro dosis de nicotina (0.016, 0.048, 0.16, 0.48 $\mu\text{g}/\text{inf}$) se hicieron disponibles a diferentes grupos de animales. Cada grupo consistió de 9-17 parejas de animales, incluyendo 2-7 ratones por grupo que previamente han experimentado una sesión de la prueba al menos un mes previamente (ver anteriormente). El pre-tratamiento con MPEP (0, 5, 10, 20 mg/kg por vía peritoneal) ocurre 15 minutos antes del inicio de la sesión de la prueba.

*Análisis de Datos**Experimento 1*

20 Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías, con dosis de MPEP como el factor intra-sujetos (4 niveles) y refuerzo como el factor entre-sujetos (4 niveles: 0.01 y 0.03 mg/kg/inf de nicotina, y pellets de alimento, disponibles en las programaciones FR5 TO20 seg y FR5 TO210 seg). Los datos fueron expresados como un porcentaje del valor basal (definido como la media de los tres días precedentes; datos de la palanca activa) y también como el número de presiones de la palanca (solo datos de la palanca inactiva). El nivel de significancia se fijó en $p<0.05$.

Experimento 2

25 Los análisis de datos se basaron en la comparación de los ratones activos como pasivos al asomar la nariz en cada pareja, utilizando la fórmula: $R = \log(A_T/P_T) - \log(A_{BL}/P_{BL})$, donde (A_T/P_T) es la proporción del número total de ratones activos contra pasivos que asoman la nariz durante la prueba de 30-min, y (A_{BL}/P_{BL}) es la proporción del número total de ratones activos contra pasivos que asoman la nariz durante la pre-prueba de 10-min. El efecto del fármaco se consideró como refuerzo, neutro o aversivo cuando R fue superior, igual o inferior que cero, respectivamente. Algunos puntos de datos (9/237 parejas de ratones) fueron excluidos de los análisis finales basándose en sí o no caen dentro de 2 desviaciones estándar de la media del grupo para esa condición específica. Los datos de auto-administración de la nicotina, obtenidos después del pre-tratamiento con solución salina, fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía con nicotina (4 niveles) definidos como el factor entre-sujetos. Los datos del criterio-R fueron analizados utilizando ANOVAs de dos vías con dosis de MPEP (4 niveles) y dosis de nicotina (4 niveles) definidas como los factores entre-sujetos. Los análisis de los datos pre-planeados del criterio-R se realizaron utilizando ANOVAs de una vía para cada dosis disponible de nicotina y solución salina auto-administrada, con dosis de MPEP (4 niveles) definidas como el factor entre-sujeto. Las comparaciones individuales apropiadas se realizaron utilizando el prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Las dosis totales auto-inyectadas de 0.048 $\mu\text{g}/\text{inf}$ de nicotina fueron analizadas utilizando un ANOVA de una vía con dosis de MPEP como el factor entre-sujetos, dado que el análisis indicó que 0.048 $\mu\text{g}/\text{inf}$ de nicotina fue la única dosis auto-administrada de forma fiable por los ratones (ver Resultados). Adicionalmente, las tasas de respuesta brutas de asomar la nariz para la dosis de nicotina que fue auto-administrada de forma fiable (0.048 $\mu\text{g}/\text{inf}$) también fueron sometidas a un análisis de ANOVA de dos vías con ratón activo/pasivo como un factor, y dosis de MPEP como el segundo factor. Los pesos corporales y los niveles de actividad pre-prueba de asomo de la nariz fueron analizados con ANOVAs de tres vías (dosis de nicotina, dosis de MPEP y ratón, i.e. activo/pasivo, definidos como factores entre-sujetos).

Resultados

Experimento 1: Efecto de administración de MPEP sobre las tasas de respuesta continuada al alimento y auto-administración de la nicotina en una programación de proporción fija de refuerzo en las ratas

50 Un efecto de interacción significativa MPEP x Refuerzo [$F(9,102) = 4.22$, $p<0.001$] indicó que MPEP afectó la respuesta continuada al alimento y la auto-administración de la nicotina de modo diferente (Fig. 6; Tabla 4).

Adicionalmente, hubo efectos de dosis principales significantes de MPEP ($F[3,102]=23.33$, $p<0.001$) y refuerzo ($F[3,34] = 14.07$, $p<0.001$) (Fig. 7). La prueba *post-hoc* Newman-Keuls indicó que 3 y 9 mg/kg de MPEP redujo significativamente la auto-administración de la dosis de nicotina de 0.01 mg/kg/infusión en relación con la condición del vehículo, mientras que disminuye la auto-administración de la dosis 0.03 mg/kg/inf solamente a 9 mg/kg. En contraste con la respuesta continuada a la nicotina, respuesta continuada al alimento bajo cualquiera de las programaciones FR5 TO20 seg o FR5 T0210 seg no se redujo significativamente a ninguna dosis de MPEP administrada. Los análisis de datos de la palanca inactiva indicaron que no hubo efecto de MPEP en la presión de la palanca inactiva para cualquiera de los refuerzos, como se indicó por la falta de un efecto principal de la dosis de MPEP. Hubo un efecto de refuerzo en la presión de la palanca inactiva [$F(3,34) = 4.47$, $p<0.01$], pero no hubo interacción significativa MPEP x Refuerzo.

Tabla 4: Número de refuerzos obtenidos durante la auto-administración de la nicotina a la rata y respuesta continuada al alimento durante la sesión total de 1 hora. Los datos se expresan como el rango de valores brutos vistos en todos los sujetos experimentales bajo condiciones basales, y también como la media \pm SEM de los refuerzos obtenidos después del pretratamiento con MPEP (0, 1, 3 y 9 mg/kg).

Refuerzo	Horario	0 mg/kg de MPEP	1 mg/kg de MPEP	3 mg/kg de MPEP	9 mg/kg de MPEP
0.01 mg/kg/inf nic	FR5 TO20 seg	18.9 \pm 2.8	21 \pm 3.1	11 \pm 2.7	9.1 \pm 3.0
0.03 mg/kg/inf nic	FR5 TO20 seg	12.9 \pm 1.2	13 \pm 1.9	11.4 \pm 1.2	4.8 \pm 1.5
45 mg de pellet de alimento	FR5 TO20 seg	122.7 \pm 6.0	131.3 \pm 8.2	122.2 \pm 7.4	109 \pm 12.98
45 mg de pellet de alimento	FR5 T0210 seg	16.1 \pm 0.4	16.3 \pm 0.3	15.2 \pm 0.5	15.2 \pm 0.6

Experimento 2: Efecto de administración de MPEP en la auto-administración de la nicotina en ratones sin tratamiento con el fármaco

El análisis estadístico de los datos del criterio-R indicó que los ratones sin tratamiento previo con el fármaco adquirieron la auto-administración de la nicotina como se indicó mediante un principal efecto de nicotina significativo [$F(4,71) = 3.4$, $p<0.05$]. Las comparaciones *post-hoc* indicaron que la auto-administración de la dosis de 0.048 μ g/inf de nicotina fue significativamente diferente de la administración de la solución salina (Figura 8). Los análisis estadísticos de los datos del criterio-R indicaron que había una tendencia hacia una interacción significativa de MPEP x dosis de nicotina [$F(3,90) = 1.89$, $p = 0.056$]. Basándose en comparaciones pre-planificadas para el efecto de MPEP en la auto-administración de cada dosis de nicotina, los ANOVAs de una vía indicaron que MPEP tuvo un efecto significativo solamente en la auto-administración de la dosis de 0.048 μ g/inf de nicotina [$F(3,46) = 3.53$, $p<0.05$], que en realidad fue la única dosis de nicotina que es administrada de forma fiable. Las comparaciones *post hoc* indicaron que MPEP redujo significativamente la auto-administración de la nicotina a todas las dosis evaluadas (Fig. 8). Curiosamente, la Figura 8A parece mostrar una tendencia para 20 mg/kg de MPEP para disminuir el criterio R por debajo de cero, indicando tal vez que esta dosis de MPEP hace aversiva la nicotina, bajo las condiciones de prueba. Los análisis no indicaron efecto significativo de MPEP en la dosis total de nicotina auto-inyectada (Fig. 8B). No obstante, MPEP disminuyó significativamente la respuesta de asomar la nariz en los ratones activos, como se indicó mediante un efecto de interacción Ratón (Activo vs Pasivo) X MPEP [$F(3,96)=3.46$, $p <0.05$]]. No hubo diferencia entre ninguno de los grupos experimentales de la pre-prueba de actividad de asomar la nariz. Además, no hubo diferencias significativas en pesos corporales entre las diferentes condiciones, como se indicó mediante una falta de una interacción significativa de tres vías. La Tabla 5 muestra los datos crudos para cada grupo de ratones, expresados como el número de veces que asoman la nariz por minuto, registradas durante la pre-prueba y durante la sesión de auto-administración, por los ratones pasivos y los activos.

Tabla 5: Los datos brutos del experimento de auto-administración en ratones. Los datos en la tabla incluyen el tamaño de muestra para cada condición, expresado como el número de parejas de ratones, y también las tasas de respuesta de asomar la nariz, registradas durante ambas sesiones de pre-prueba y prueba, bajo todas las condiciones, de ambos sujetos activos y pasivos, expresados como la media de las respuestas por minuto \pm SEM. Para la dosis 0.048 μ g/kg/inf de nicotina, hubo una interacción significativa entre los factores del ratón (activo vs pasivo) y el factor MPEP lo que indica que MPEP afectó diferencialmente las tasas de asomar la nariz en los ratones activos frente a los pasivos.

Nicotina ($\mu\text{g}/\text{inf}$)	MPEP (mg/kg)	<i>n</i>	pre-prueba activo	prueba activo	pre-prueba pasivo	prueba pasivo
0	0	15	8.79 \pm 0.98	4.62 \pm 1.05	9.37 \pm 1.11	4.05 \pm 0.82
0	5	10	8.19 \pm 1.03	4.99 \pm 1.17	8.38 \pm 0.96	6.41 \pm 1.38
0	10	10	7.95 \pm 0.99	4.92 \pm 1.1	8.00 \pm 1.06	5.86 \pm 1.56
0	20	10	6.98 \pm 1.18	5.96 \pm 1.69	8.50 \pm 1.43	6.33 \pm 1.66
0.016	0	13	8.0 \pm 1.22	3.88 \pm 0.46	8.85 \pm 1.25	4.56 \pm 0.86
0.016	5	11	7.86 \pm 0.87	2.62 \pm 0.49	8.01 \pm 0.91	3.46 \pm 0.74
0.016	10	13	7.79 \pm 0.83	6.48 \pm 1.05	8.22 \pm 0.87	4.26 \pm 0.94
0.016	20	10	7.10 \pm 0.87	5.48 \pm 1.09	7.35 \pm 0.85	8.77 \pm 1.85
0.048	0	17	8.04 \pm 0.89	5.42 \pm 1.19	8.50 \pm 1.07	3.06 \pm 0.68
0.048	5	12	9.13 \pm 1.37	3.43 \pm 0.67	8.93 \pm 1.36	4.45 \pm 1.06
0.048	10	11	7.43 \pm 0.98	3.92 \pm 1.18	8.06 \pm 1.39	5.83 \pm 1.72
0.048	20	10	8.36 \pm 1.07	3.56 \pm 1.04	8.31 \pm 1.28	5.29 \pm 1.11
0.16	0	16	7.58 \pm 0.77	3.63 \pm 0.58	7.69 \pm 0.88	3.9 \pm 0.69
0.16	5	14	8.32 \pm 0.94	4.67 \pm 0.95	8.48 \pm 3.31	4.32 \pm 2.37
0.16	10	11	7.12 \pm 0.66	4.19 \pm 0.81	7.20 \pm 0.69	4.62 \pm 0.82
0.16	20	10	7.50 \pm 1.25	5.06 \pm 1.52	7.56 \pm 1.32	7.97 \pm 1.76
0.48	0	15	6.50 \pm 0.90	2.29 \pm 0.25	6.77 \pm 0.87	3.28 \pm 0.5
0.48	5	9	8.12 \pm 1.17	3.04 \pm 0.73	8.58 \pm 1.38	3.25 \pm 0.88
0.48	10	10	7.49 \pm 0.86	3.58 \pm 0.73	7.48 \pm 0.88	3.81 \pm 0.47
0.48	20	10	7.31 \pm 0.98	4.67 \pm 1.22	7.08 \pm 0.94	4.35 \pm 0.98

Discusión

5 Los resultados del estudio actual indicaron que la administración de MPEP disminuyó selectivamente la auto-administración de la nicotina en la rata con una eficacia mayor a la dosis más baja disponible de nicotina, sin afectar la respuesta continuada al alimento sobre cualquiera de las dos programaciones de alimento-continuado de refuerzo empleadas. Además, se demostró que la administración de MPEP en ratones sin tratamiento previo con el fármaco suprime la auto-administración de la dosis de nicotina la cual se demostró que se administra de forma fiable (0.048 $\mu\text{g}/\text{inf}$ nicotina). Estos datos indican que el pretratamiento de MPEP redujo la eficacia de refuerzo de la nicotina auto-administrada por vía intravenosa en dos diferentes especies de roedores.

10 En las ratas no se observaron efectos supresores motores obvios que podrían explicar la reducción en la auto-administración de la nicotina, según lo indicado mediante el mantenimiento de niveles altos de la respuesta al alimento en cualquiera de las dos programaciones de refuerzo, uno de los cuales igualará las tasas de respuesta a las vistas en la nicotina. En el experimento de los ratones no hubo efecto de la administración de MPEP en la actividad de asomar la nariz. Estudios previos por lo general no han indicado efectos de MPEP en la actividad

15

locomotora en roedores. En las ratas, MPEP a dosis de 2.5 -10 mg/kg, suministradas por vía peritoneal (i.p.), no tuvieron efecto en la actividad locomotora exploratoria en las ratas (Tatarczynska et al. 2001; Henry et al. 2002), aunque otros estudios indicaron que dosis mucho más altas de MPEP inhibieron la actividad locomotora espontánea; sino incluso dosis muy altas no tuvieron efecto en el rendimiento rota-rod (Spooren et al. 2000a). De manera similar en ratones, Tatarczynska and co-workers (2001) demostraron que 30 mg/kg de MPEP (i.p.) no tuvieron efecto en el rendimiento rota-rod, pero un estudio diferente (Spooren et al. 2000a) demostró que una dosis mucho más alta de MPEP redujo la actividad vertical; En resumen, trabajos previos y los actuales datos en la respuesta continuada al alimento en las ratas indican que en la dosis de MPEP utilizada en el estudio actual, efectos motores no-específicos son muy poco probables para explicar la auto-administración reducida de la nicotina. Adicionalmente, las diferencias observadas en los efectos de MPEP sobre la respuesta continuada a la nicotina frente a la del alimento no se pueden atribuir a un efecto dependiente de la tasa, dado que el uso de la programación FR5 TO210 seg proporcionó tasas equivalentes de la respuesta para la nicotina y el alimento e incluso bajo estas condiciones MPEP no afectó la respuesta al alimento.

Con la técnica de auto-administración del ratón utilizada en el estudio actual, los ratones demostraron que la auto-administración a una de las cinco dosis evaluadas a través de un amplio rango de dosis de nicotina. Este procedimiento para la auto-administración en ratones sin tratamiento previo con el fármaco ha sido utilizado para estudiar la auto-administración de la morfina (Semenova et al. 1995, 1999; Kuzmin et al. 1996a, 1997), cocaína (Kuzmin et al. 1996b; 1997), etanol (Kuzmin et al., 1999), nicotina (Stolerman et al. 1999; Fattore et al. 2002), anfetamina (Cossu et al., 2001) y ácido gamma-hidroxibutírico (Martellota et al. 1998). Un amplio rango de dosis de nicotina fue utilizado en el estudio actual debido a la incertidumbre sobre el probable rango de dosis auto-administrada de nicotina en los ratones DBA/2J utilizados, y para permitir grandes cambios en la curva dosis de nicotina-respuesta después del pretratamiento de MPEP. Aunque sólo se puede extraer limitadas conclusiones de estudios que utilizan solamente una dosis unitaria del fármaco auto-administrada, los datos actuales de los ratones se presentan en el contexto de, y en adición a, los extensos estudios de auto-administración en la rata. La abstinencia parcial utilizada en el procedimiento del ratón podría aumentar el comportamiento de auto-administración del fármaco (Piazza et al. 1990; Shaham et al. 1993; Ramsey and Van Rees 1993), aunque el estrés físico (i.e. shock del pie) se demostró previamente que no afecta la auto-administración de morfina utilizando el presente procedimiento (Kuzmin et al., 1996). En contraste con la técnica del ratón, las metodologías empleadas en los experimentos de ratas en el estudio actual examinaron el comportamiento de auto-administración a dos diferentes dosis unitarias de nicotina, y examinaron el mantenimiento en lugar de la adquisición de la auto-administración de la nicotina. Adicionalmente, los estudios de rata incluyeron dos programaciones de alimento-continuado de refuerzo, con una programación (FR5 TO20 seg) idéntica a la programación utilizada para el trabajo de auto-administración de la nicotina, y otra programación (FR5 TO 210 seg) se utilizó para equilibrar los niveles de la respuesta para la nicotina y el alimento. Los resultados de las respuestas obtenidas del experimento de ratón, se demostró que MPEP reduce significativamente la auto-administración de la dosis de 0.048 µg/inf de nicotina, según se mide por el criterio R. En contraste, aunque hubo una tendencia hacia un efecto de MPEP en la ingesta total de la nicotina, no fue significativa. No obstante, el ANOVA de dos vías en los datos brutos de asomar la nariz en la dosis de 0.048 µg/inf de nicotina indicó claramente un efecto diferencial del pretratamiento de MPEP en ratones activos contra pasivos, con los ratones activos que muestran tasas disminuidas de asomar la nariz después de la administración de MPEP. En resumen, aunque los datos obtenidos del experimento de ratón en el estudio actual, considerados aisladamente, proporcionan sólo una evidencia limitada del efecto de MPEP en la auto-administración de la nicotina, no proporcionan evidencia convergente para los datos más completos y convincentes proporcionados en los experimentos de ratas.

Los efectos de MPEP en la auto-administración de la nicotina en roedores son consistentes con aquellos vistos previamente de la auto-administración de cocaína en ratones (Chiamulera et al. 2001). Se demostró que los ratones mutantes con una delección de mGluR5 no adquirieron la auto-administración de cocaína a ninguna de las dosis efectivas en los controles de tipo salvaje, pero la respuesta continuada al alimento no se afectó. El efecto de la delección de mGluR5 se confirmó vía administración de MPEP en ratones del tipo salvaje, que se demostró que dependientemente de la dosis reduce la auto-administración de la cocaína sin afectar la respuesta continuada al alimento. Curiosamente, los autores demostraron que la administración de la cocaína dio lugar a un similar aumento en los niveles de dopamina en el NAcc tanto en los ratones mutantes como en los de tipo salvaje, indicando tal vez que solo los aumentos de los niveles de dopamina del cerebro medio, no son suficientes para mantener la auto-administración de la cocaína. Esta hipótesis se soporta por los recientes hallazgos indicando que los ratones carentes del receptor de dopamina (D2) se auto administran la cocaína (Caine et al. 2002), y los carentes del receptor de dopamina (D1) adquieren preferencia de lugar condicionada inducida por la cocaína (Miner et al. 1995). No obstante, aunque no hubo diferencia en el nivel absoluto de los niveles de dopamina NAcc entre los ratones carentes de mGluR5 en comparación con los ratones de tipo salvaje, hubo una diferencia aparente en el tiempo necesario para los niveles de dopamina de NAcc para aumentar a esos niveles. Tal vez, es esta diferencia la que dio lugar a las diferencias observadas en la auto-administración de cocaína y la hiperlocomoción inducida por la cocaína entre los ratones de tipo salvaje y los ratones mutantes deficientes de mGluR5 homocigotos.

En cuanto a los efectos de recompensa de nicotina aguda, un estudio reciente (Harrison et al. 2002) investigó el efecto de la administración de MPEP en la recompensa de la nicotina según se mide en un procedimiento de

estimulación de recompensa del cerebro. La administración de MPEP no tuvo efecto sobre el efecto de reducción de la recompensa de 0.25 mg/kg de nicotina (Harrison et al. 2002), aunque MPEP solo elevó los umbrales de recompensa del cerebro. Esta discrepancia en los resultados se pueden deber a las dosis mucho más altas (0.125 y 0.25 mg/kg i.p.) de nicotina administradas en el estudio previo (por el investigador), en comparación con el efecto de 0.03 o 0.01 mg/kg/inf de nicotina auto-administrada, suministrada en varias ocasiones y por vía intravenosa. Es importante destacar, los sustratos neurobiológicos que subyacen la auto-estimulación hipotalámica lateral y la auto-administración intravenosa de la nicotina puede ser muy diferente (Harrison et al. 2002), y pueden ser estas las diferencias que subyacen los diferentes efectos de MPEP en los dos estudios.

Un número de estudios ha indicado un papel de mGluRs en la modulación de la neurotransmisión de dopamina en el cuerpo estriado y el NAcc, y por lo general, se piensa que mGluRs del grupo I (mGluR5 y mGluR1) se involucran en la modulación de respuestas postsinápticas (Schoepp 2001). Curiosamente, hace poco se encontró que la administración intra-accumbens de un antagonista de mGluR del grupo I bloqueó el efecto de activación locomotora de un agonista del receptor D-1 (David and Abbraini 2001). Como se indicó anteriormente, se ha demostrado previamente que mGluR5s se concentran fuertemente en el NAcc, donde los aumentos significantes en los niveles de dopamina extracelular se ven después de la administración de la nicotina. Además, la ausencia de mGluR5s en ratones dio lugar a la ausencia de la auto-administración de la cocaína y la hiperactividad inducida por la cocaína, e incluso incrementos en dopamina del NAcc inducidos por la cocaína eran relativamente inalterados (Chiamulera et al. 2001). En conjunto con los presentes hallazgos que indican el efecto de MPEP en la auto-administración de la nicotina, una de las explicaciones es que mGluR5s juegan un papel modulador en la respuesta postsináptica para liberar la dopamina inducida por el fármaco en el NAcc, disminuyendo así la auto-administración de la nicotina. Por otra parte, dado el papel de glutamato en la mediación de los efectos de recompensa de tanto la nicotina (Watkins et al. 2000) como la cocaína (Zhang et al. 2001), puede ser que la dopamina juegue un papel menos crítico en la mediación de los efectos de recompensa de psicoestimulantes que por lo general es la hipótesis.

El efecto similar ansiolítico de MPEP se puede relacionar con sus efectos en la auto-administración de la nicotina y de la cocaína. La nicotina puede ser ansiogénica a dosis más altas (File et al. 1998; Irvine et al. 2001), aunque también se ha demostrado que es ansiolítica a dosis inferiores (File et al. 1998; Szyndler et al. 2001). La administración de anfetamina, cocaína y nicotina, todas aumentan los niveles en plasma de hormonas de estrés en animales de laboratorio (para la revisión, ver Samyai et al. 2001). Se ha planteado la hipótesis que los efectos ansiogénicos de la nicotina auto-administrada crónica observada en las ratas, pueden jugar un papel en mantener la auto-administración de la nicotina (Irvine et al. 2001). El pretratamiento con los compuestos de la benzodiazepina ansiolíticos redujo selectivamente la respuesta continuada de la cocaína sin afectar el comportamiento del alimento-continuado en las ratas (Goeders et al. 1989; 1993; Goeders 1997). Estudios previos han indicado el efecto similar ansiolítico de MPEP en roedores (Spooren et al. 2000b; Tatarczynska et al. 2001). Por consiguiente es posible que los efectos ansiolíticos de MPEP puedan bloquear los niveles de ansiedad aumentados ligeramente inducidos por la nicotina, y por lo tanto pueden bloquear parte de sus efectos de recompensa.

En resumen, el estudio actual indicó que el pretratamiento de MPEP redujo significativamente la auto-administración de la nicotina sin ningún efecto en la respuesta continuada al alimento en las ratas y en ratones sin tratamiento con el fármaco en la ausencia de cualquier actividad supresora motora. Se plantea la hipótesis en este documento que la administración de MPEP modula la respuesta postsináptica a mayores niveles de dopamina inducidos por la nicotina en el campo de terminales del circuito mesolímbico. No obstante, dados los límites de los experimentos actuales y los conocimientos actuales en la localización precisa y la función de mGluR5s, los modos de acción de MPEP en diferentes sitios del NAcc y/o vía un efecto similar ansiolítico, no se puede descartar. Los actuales resultados pueden indicar una nueva diana terapéutica para anti-tabaquismo, y en general, medicamentos anti-abuso.

Ejemplo 3

Pruebas adicionales para la utilidad del bloqueo simultáneo de los receptores metabotrópicos de glutamato 5 y metabotrópicos de glutamato 2/3 en el tratamiento del fármacodicción y la depresión

Este Ejemplo ilustra que el bloqueo de transmisión glutamatérgica en los receptores mGlu5 y/o mGlu2/3 disminuye las propiedades reforzantes de la cocaína y la nicotina (datos actuales; Paterson et al. 2003), e indica que el bloqueo simultáneo de estos receptores tiene efectos aditivos en la inhibición del consumo de fármacos. Se ha demostrado que la mayoría de las drogas aumentan la transmisión glutamatérgica excitatoria en todos los circuitos de recompensa del cerebro (Kalivas and Duffy, 1998; Mansvelter and McGehee, 2000; Ungless et al., 2001; Wolf, 2003). Aunque la función exacta de la transmisión glutamatérgica excitatoria en la regulación de los circuitos de recompensa del cerebro no es clara, incrementos en la transmisión glutamatérgica excitatoria contribuyen a las propiedades reforzantes de las drogas adictivas. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la transmisión glutamatérgica disminuye las acciones de recompensa de la cocaína y otras drogas de abuso (Harris and Aston-Jones, 2003; Laviolette and van der Kooy, 2003).

Ha habido un interés reciente en el papel del receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGlu5) en la regulación de los efectos de refuerzo de fármacos adictivas basándose en las observaciones de Chiamulera and colleagues (2001)

demonstrando que los ratones en los cuales el gen del receptor mGlu5 fue suprimido, no adquirieron el comportamiento de auto-administración de la cocaína. Sin embargo, la adquisición de auto-administración del alimento no se afectó en estos ratones, demostrando que la disminución en el consumo de la cocaína en estos ratones no fue secundaria a un déficit en los procesos de aprendizaje (Chiamulera et al., 2001). De acuerdo con lo anterior, el antagonista selectivo del receptor mGlu5 MPEP, disminuyó la auto-administración de cocaína en ratones control de tipo salvaje (Chiamulera et al., 2001). De manera similar, como se muestra anteriormente en el Ejemplo 2, MPEP disminuyó la auto-administración de la nicotina en ambos ratas y ratones, y atenúo la preferencia de lugar condicionada inducida por la cocaína- y la morfina- (McGeehan and Olive, 2003; Popik and Wrobel, 2002). Más recientemente, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores metabotrópicos de glutamato 2/3 (mGlu2/3) atenúa las acciones de comportamiento de muchas drogas de abuso (David and Abbrain, 2003). Además, como se ilustra en el Ejemplo 1, el antagonista del receptor mGlu2/3 LY341495 atenúa los déficits en función de la recompensa del cerebro, medida por las elevaciones en los umbrales de recompensa de ICSS, observadas en las ratas que experimentan abstinencia espontánea de la nicotina (señales similares a la depresión). En conjunto, estos datos sugieren que los receptores Glu5 y mGlu2/3 juegan un papel crucial en la regulación de las acciones de comportamiento de varias drogas de abuso incluyendo la cocaína y la nicotina, y los síntomas depresivos vistos en la drogadicción y las depresiones inducidas por la ausencia del fármaco.

Se ha demostrado que la administración aguda de la cocaína baja los umbrales inferiores de auto estimulación intracerebral (ICSS) (Esposito et al., 1978; Frank et al., 1988; Kenny et al., 2003a; Kenny et al., 2003b; Kokkinidis and McCarter, 1990; Markou and Koob, 1992). Debido a que ICSS activa directamente los circuitos de recompensa del cerebro (Olds and Millner, 1954), se piensa que los umbrales de ICSS proporcionan una medida operacional de la función de recompensa del cerebro. Por lo tanto, la reducción en los umbrales de ICSS observados después de la administración de la cocaína refleja un aumento en la función de recompensa del cerebro que más probablemente subyace los efectos euforizantes de la cocaína. Este aumento en la función de recompensa del cerebro asociado con el consumo de cocaína se considera pertinente para el establecimiento y el mantenimiento del comportamiento de auto-administración de la cocaína (Kenny et al., 2003b; Stewart et al., 1984).

El primer objetivo de los estudios actuales fue investigar los efectos de MPEP en la auto-administración de la nicotina en las ratas, y en la auto-administración de cocaína en las ratas con dos programaciones diferentes de acceso diario (1 y 6 h) a la auto-administración de la cocaína. Después, investigamos si MPEP disminuyó la "motivación" de las ratas para obtener la cocaína o la nicotina examinando si MPEP disminuyó la respuesta de la cocaína o la nicotina bajo una programación de refuerzo de proporción progresiva. A continuación investigamos si MPEP disminuyó el estado afectivo positivo asociado con el consumo de cocaína, examinando si MPEP atenúa las acciones disminuidas de cocaína administrada de forma aguda en los umbrales de ICSS. Después, examinamos los efectos del antagonista del receptor mGlu2/3 LY341495, previamente se demostró que atenúa la abstinencia de la nicotina (Kenny et al., 2003c), en la auto-administración de la nicotina en las ratas. Por último, examinamos si el bloqueo simultáneo de los receptores de mGlu5 y mGlu2/3, mediante la combinación de MPEP y LY341495, tuvieron un efecto inhibitorio aditivo en el comportamiento de la auto-administración de la nicotina.

Materiales y métodos

(i) Sujetos

Los sujetos fueron ratas de la cepa Wistar con un peso de 300-320 g al llegar al laboratorio. Las ratas fueron obtenidas de Charles River Laboratories (Raleigh, NC) y fueron alojadas en grupos de dos o tres por jaula, con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en un bioterio a temperatura controlada bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 hr (las luces se apagaban a las 10:00 am). En cada caso los animales fueron evaluados durante la parte de oscuridad del ciclo de luz/oscuridad. Todos los animales se trataron de acuerdo con las normas del National Institutes of Health en relación con los principios del cuidado animal. Las instalaciones de los animales y los protocolos experimentales estuvieron de acuerdo con the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care.

Drogas

El clorhidrato de cocaína y el (-) hidrógeno tartrato de nicotina fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. 2-Metil-6-[feniletinil]-piridina fue sintetizado de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. LY341495 fue obtenido de Tocris. Las drogas fueron preparadas inmediatamente antes de cada administración. Para la administración sistémica de la cocaína, la cocaína se disolvió en solución salina estéril 0.9 % (w/v), y se administró por inyección intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1 ml/kg de peso corporal, 10 min antes de la sesión experimental de ICSS. Para la administración sistémica de MPEP, MPEP se disolvió en agua estéril y se administró por inyección i.p., en un volumen de 1 ml/kg de peso corporal, 30 min antes del ICSS o la sesión de auto-administración. Para la administración sistémica de LY341495, LY341495 se disolvió en solución salina estéril y se administró por inyección i.p., en un volumen de 3 ml/kg de peso corporal, 30 min antes de la sesión de auto-administración.

Equipos

El entrenamiento de auto-estimulación intracraneal y la prueba se llevaron a cabo en dieciséis cámaras operantes de Plexiglas (25 x 31 x 24 cm) (Med Associates, St. Albans, VT). Los suelos de las cámaras operantes fueron construidas de varillas de aluminio paralelas espaciadas a 1.25 cm. Una pared contenía una rueda metálica manipulandum que necesita 0.2 N de fuerza para girarla un cuarto de una vuelta. La rueda (5 cm de ancho) salió de la pared -3 cm. Cada cámara de prueba fue encerrada dentro de una cámara atenuada de luz y sonido (62 x 63 x 43 cm). La estimulación intracraneal fue administrada por estimuladores de corriente constante (Stimtech modelo 1200; San Diego Instruments, San Diego, CA). Los sujetos fueron conectados al circuito de estimulación a través de correas bipolares flexibles (Plastics One, Roanoke, VA) conectadas a conmutadores giratorios de contacto de oro montados anteriormente en la cámara. Los parámetros de estimulación, los datos de recolección, y todas las funciones de la sesión de prueba se controlaron por un microordenador.

La auto-administración de la cocaína y de la nicotina se llevaron a cabo en 16 cámaras operantes atenuadas al sonido de Plexiglas (29 x 24 x 19.5 cm). En cada cámara, una pared contenía una palanca retráctil de metal que se montó 2.5 cm arriba del suelo y se necesita una fuerza de 0.1 N para ser pulsada. Eslabones giratorios sobre un eje de plástico, conectaron los animales a las jeringas operadas por las bombas Razel que suministran la droga. La recolección de los datos y todas la funciones de programación se controlaron por un microordenador compatible IBM.

Cirugía

Las ratas preparadas con catéteres intravenosos fueron anestesiadas por inhalación de 1-3% de isoflurano en oxígeno y se prepararon con catéteres silásticos, implantados quirúrgicamente en la vena yugular como se describe previamente (Caine et al., 1993). El catéter se pasó por vía subcutánea a un ensamblaje de polietileno montado en la espalda del animal. Este ensamblaje consistió de una cánula guía (Plastic One Co., Roanoke VA) unida a una pieza de 4 cm² de malla marlex con epoxi. La malla marlex se colocó bajo la piel en la espalda del animal. Después de la cirugía, los catéteres fueron purgados diariamente con 0.15 ml de una solución de antibiótico estéril que contiene solución salina heparinizada (30 unidades USP/ml) y Timentina (100 mg/ml; SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Philadelphia, Pa.). Las ratas preparadas con los electrodos de ICSS fueron anestesiadas por inhalación de 1-3% isoflurano en oxígeno y se colocaron en un marco esterotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA). La barra de los incisivos se ajustó a 5 mm encima de la línea interaural, y el cráneo se expuso. Los electrodos estimulantes bipolares de acero inoxidable (11 mm de longitud) fueron implantados en el hipotálamo lateral posterior (AP: -0.5 mm del bregma; ML: ±1.7 mm; DV: 8.3 mm de dura, con la barra de los incisivos colocada 5 mm encima de la línea interaural), de acuerdo con el atlas de Pellegrino et al. (1979). Cuatro indentaciones se hicieron en el cráneo para acomodar los tornillos, junto con la aplicación del acrílico dental, sujetaron el electrodo en el lugar. Se les permitió a los animales recuperarse de la cirugía por al menos 7 días antes del entrenamiento en los procedimientos de ICSS o de auto-administración.

Procedimiento de auto-administración por vía intravenosa de cocaína

Las ratas (n=14) tuvieron restricción de alimento para mantenerlos al 85% de su peso corporal normal obtenido bajo condiciones libres de alimentación, a continuación se entrenaban para pulsar una palanca para 45 mg de pellets de alimento en una programación de refuerzo de proporción fija 5 (FR5). Una vez que se logró una respuesta estable para el refuerzo de alimento, las ratas se probaron para la auto-administración de cocaína durante sesiones diarias de 1 h por nueve días en una programación de refuerzo FR5, cuando cinco respuestas en la palanca dieron lugar a la administración de una inyección de cocaína (250 µg/inyección disueltos en 0.1 ml de solución salina estéril al 0.9 %; suministrada durante 4 seg) e inició un periodo de tiempo de espera (TO) de 20 seg, marcado por una señal de luz localizada arriba de la palanca, tiempo durante el cual la respuesta en la palanca fue sin consecuencias. Por lo tanto, fue utilizada una programación de refuerzo FR5 T020 seg.

Procedimiento de auto-administración por vía intravenosa de la nicotina

Aproximadamente 1 semana después de la preparación con los catéteres en la vena yugular, las ratas (n=8) fueron entrenadas para auto-administrarse la nicotina (0.03 mg/kg por infusión, base libre) con una programación FR5 T020 seg, similar a aquella descrita anteriormente para la cocaína. La respuesta en la palanca activa dio lugar a la administración de solución de nicotina en un volumen de 0.1 ml por infusión durante un periodo de 1 seg (Razel Scientific Instruments Inc., Stamford, Conn., USA), mientras que la respuesta en la palanca inactiva no tuvo consecuencias. Se consideró que las ratas habían adquirido una respuesta operante estable cuando pulsaban la palanca activa más de dos veces que el número de veces que pulsaban la palanca inactiva, recibieron un mínimo de seis infusiones o 90 pellets por sesión de 1 h, con una variación inferior del 20% en el número de refuerzos obtenidos por sesión. Las ratas tomaron aproximadamente 2 semanas para establecer tasas estables de respuesta operante. Todas las sesiones de la prueba fueron conducidas durante 1 h por días, 5 días por semana.

Procedimiento de umbral de recompensa de auto-estimulación intracraneal (ICSS) (Markou and Koob, 1991; 1993)

Las ratas ($n=9$) fueron entrenadas para responder de acuerdo con una modificación del procedimiento del umbral corriente de la prueba discreta de Kornetsky and Esposito (1979). Brevemente, una prueba se inició mediante la administración de un estímulo eléctrico no-contingente. Este refuerzo eléctrico tuvo una duración de entrenamiento de 500 ms y consistió de impulsos catódicos rectangulares de 0.1 msec, que fueron administrados a una frecuencia de 50-100 Hz. La frecuencia de la estimulación se seleccionó para animales individuales de tal manera que los umbrales de intensidad-corriente basal de cada sujeto estuvieron dentro de 50-200 KA, y por lo tanto permite tanto las elevaciones del umbral como las disminuciones para ser detectado. La frecuencia se mantuvo constante en todo el experimento. Un giro de un cuarto de la rueda manipulandum dentro de 7.5 seg de la administración del estímulo eléctrico no-contingente dio lugar a la administración de un estímulo eléctrico idéntico en todos los parámetros para el estímulo no-contingente que inició la prueba. Después de un intervalo inter-ensayo variable (7.5-12.5 seg, media de 10 seg), otra prueba se inició con la administración de un estímulo eléctrico no-contingente. La falta de respuesta para el estímulo no-contingente dentro de 7.5 seg dio lugar al inicio del intervalo inter-ensayo. La respuesta durante el intervalo inter-ensayo retrasó el inicio de la siguiente prueba por 12.5 seg. Los niveles de corriente se variaron en la serie de alternancia descendente y ascendente. Un conjunto de tres ensayos se presentó para cada intensidad de la corriente. Las intensidades de corriente se alteraron en etapas 5 μ A. En cada sesión de la prueba, cuatro alternancias de la serie descendencia-ascendencia se presentaron. El umbral para cada serie se definió como el punto medio entre dos intensidades de corriente consecutivas que produjeron "puntuaciones positivas" (los animales respondieron por al menos dos de los tres ensayos) y dos intensidades de corriente consecutivas que produjeron "puntuaciones negativas" (los animales no responden a dos o más de los tres ensayos). El umbral general de la sesión se definió como la media de los umbrales para las cuatro series individuales. Cada sesión de la prueba tuvo - 30 min de duración. El tiempo entre el inicio de los estímulos no-contingentes y una respuesta positiva fue registrado como la latencia de respuesta. La latencia de respuesta para cada sesión de la prueba se definió como la media de la latencia de respuesta de todos los ensayos durante los cuales una respuesta positiva ocurre. Después del establecimiento de los umbrales estables de ICSS de recompensa, las ratas fueron probadas en el procedimiento de ICSS una vez al día excepto para el curso temporal de acciones disminuidas de la cocaína en los umbrales de ICSS cuando las ratas fueron probadas en los puntos de tiempo de acuerdo con el diseño experimental.

Experimento 3.1: Efectos de administración de MPEP en la auto-administración de la cocaína bajo una programación de refuerzo de Proporción Fija

Después del entrenamiento en el paradigma de auto-administración de cocaína bajo una programación de refuerzo de proporción fija (FR), como se describe anteriormente, dos grupos balanceados de ratas se formaron de tal manera que su tasa de auto-inyecciones de cocaína no difiere bajo las condiciones basales. A partir del día 10 en adelante (el periodo de "incremento escalonado"), el acceso a la auto-administración de la cocaína se incrementó de 1 h a 6 h por sesión diaria en un grupo de ratas (de Acceso Largo o ratas LgA; $n=7$). Estudios previos han demostrado que esta programación de acceso a la auto-administración de cocaína se traduce en un aumento progresivo o "incremento escalonado" en el consumo de cocaína diario (Ahmed and Koob, 1997; Ahmed et al. 2001). En el otro grupo (Aceso Corto o ratas ShA; $n=7$), el acceso a la auto-administración de cocaína fue continuado a 1 h por sesión diaria. Estudios previos han demostrado que esta programación de acceso a la auto-administración de cocaína mantiene un nivel estable de consumo de cocaína diario. Después de 22 días de acceso diario de 1 h (ShA) o 6 h (LgA) a la auto-administración de cocaína, ambos grupos de ratas recibieron su primera inyección de MPEP. Las ratas LgA y ShA fueron inyectadas con MPEP (0, 1, 3 o 9 mg/kg) de acuerdo con un diseño de cuadrado Latino intra-sujetos, y la sesión de auto-administración de cocaína diaria inició 30 min después. Un mínimo de 48 h se dejó entre cada inyección en el diseño de cuadrado Latino, durante el cual las ratas LgA y ShA tuvieron su sesión de auto-administración de cocaína diaria, para asegurar que las tasas de la respuesta de la cocaína volvieran a la pre-inyección basal antes de la siguiente administración de MPEP. Después de la terminación del cuadrado-Latino, todas las ratas recibieron una inyección de MPEP (6 mg/kg), y la sesión de auto-administración de cocaína diaria se inició 30 min más tarde.

Experimento 3. 2: Los efectos de MPEP en la auto-administración de la cocaína y la nicotina bajo una programación de refuerzo de Proporción Progresiva

Bajo una programación de refuerzo de proporción fija, como se describe anteriormente, un animal responde un número de veces "fijo" en una palanca activa para obtener una infusión del fármaco. Las programaciones de refuerzo de proporción Fija (FR) proporcionan importante información sobre si una droga está reforzada. En contraste, bajo unas programaciones de refuerzo de proporción progresiva (PR), cada vez que un animal responde en la palanca activa para recibir una infusión del fármaco, el número de veces que el animal debe responder posteriormente para recibir la siguiente infusión se aumentó progresivamente. Mediante la determinación de lo duro que un animal está dispuesto a trabajar por una droga, mientras que limita la ingesta total, la programación PR permite una mejor separación de la motivación para el consumo del fármaco a partir de los posibles efectos saciantes de dosis del fármaco acumuladas (Stafford et al. 1998). Tales características resultan en teóricamente diferentes interpretaciones de los factores que controlan el comportamiento de búsqueda del fármaco en una PR en comparación con una FR. Por ejemplo, algunos investigadores han sugerido recientemente que las programaciones

FR miden los efectos placenteros o hedónicos de una droga (McGregor and Roberts 1995; Mendrek et al. 1998), mientras que las programaciones PR proporcionan una mejor medida del incentivo o la “motivación” para obtener una droga (Markou et al., 1993). Después de la adquisición de la auto-administración de la cocaína o la nicotina bajo un FR, como se describe anteriormente, las ratas fueron cambiadas a una programación de refuerzo PR en la cual la siguiente secuencia del nivel de presión fue necesaria para recibir cada posterior infusión de nicotina o cocaína: 5, 10, 17, 24, 32, 42, 56, 73, 95, 124, 161, 208, etc. Las ratas fueron inyectadas con MPEP (0, 1, 3 o 9 mg/kg) 30 min antes de cada sesión de PR. Todas las sesiones de PR se prolongaron por 3 h. Todos los sujetos alcanzaron los puntos de quiebre durante la sesión de 3 horas. El punto de quiebre se define como la proporción más alta lograda antes de que la sesión se terminó; la sesión se terminó si el sujeto falló para ganar una infusión del fármaco durante una hora.

Experimento 3.3: Los efectos de MPEP sobre la reducción inducida por la cocaína de los umbrales de ICSS

En el Ejemplo 3.2 se demostró que MPEP disminuye la auto-administración de la nicotina, bajo un FR, en las ratas y ratones. Los estudios en este Ejemplo (los resultados se describen a continuación) demuestran que MPEP disminuyó la auto-administración de la cocaína y la nicotina en las ratas (en el caso de la nicotina en los ratones también) bajo una FR, y disminuyó la auto-administración de la cocaína y la nicotina en las ratas bajo una programación de refuerzo PR. Un posible mecanismo por el cual MPEP puede haber disminuido el comportamiento de auto-administración de la cocaína, fue la disminución de las acciones hedónicas de cocaína. La reducción inducida por la cocaína de los umbrales de ICSS representa una medida precisa de acciones hedónicas y euforizantes de la cocaína. Por lo tanto, para probar la hipótesis que MPEP atenúa las acciones hedónicas de la cocaína, examinamos si MPEP bloqueó la reducción inducida por la cocaína de los umbrales de ICSS. La dosis de cocaína (10 mg/kg) utilizada en estos estudios fue elegida basándose en observaciones previas que esta dosis de cocaína indujo la reducción del umbral máximo sin afectar el rendimiento en el procedimiento de ICSS utilizada en el estudio actual (Kenny et al., 2002b; Markou & Koob 1992), y fue equivalente a la cantidad de cocaína consumida por ratas ShA durante su acceso de 1 h diario a la auto-administración de cocaína. Las ratas ($n=9$) fueron preparadas con electrodos de ICSS como se describe anteriormente, y se entrenan en el procedimiento de ICSS hasta que los umbrales estables fueron logrados ($\leq 10\%$ de variación en los umbrales durante 5 días consecutivos). Para determinar si MPEP atenúa la magnitud de los efectos de disminución del umbral de la cocaína, las ratas fueron inyectadas con MPEP (0, 3, 6 o 9 mg/kg) de acuerdo con un diseño de cuadrado Latino intra-sujetos, 30 min antes del inicio de la sesión de ICSS. Luego todas las ratas recibieron una inyección de solución salina 20 min antes, 10 min antes del inicio de la sesión de ICSS. Se dejó transcurrir un periodo de 72 h entre cada inyección diaria en el diseño de cuadrado Latino, durante el cual los umbrales de ICSS diarios continuaron siendo evaluados para asegurar que los umbrales de ICSS regresen a valores basales de pre-inyección antes de la siguiente administración del fármaco. Después de la terminación del cuadrado-Latino, todas las ratas recibieron una inyección de MPEP (1 mg/kg), 30 min antes del inicio de la sesión de ICSS, y una inyección de solución salina 10 min antes del inicio de la sesión de ICSS. Después de este régimen de tratamiento, las ratas se inyectaron de nuevo con MPEP (0, 3, 6 o 9 mg/kg) de acuerdo con un diseño de cuadrado Latino intra-sujetos 30 min antes del inicio de la sesión de ICSS. Todas las ratas luego recibieron una inyección de cocaína (10 mg/kg) en lugar de solución salina 20 min más tarde, 10 min antes del inicio de la sesión de ICSS. Se dejó un periodo de 72 h entre cada inyección diaria en el diseño de cuadrado Latino, durante el cual los umbrales de ICSS diarios continuaron siendo evaluados para asegurar que los umbrales de ICSS vuelven a los valores basales de pre-inyección antes de la siguiente administración del fármaco. Después de la terminación del cuadrado-Latino, todas las ratas recibieron una inyección de MPEP (1 mg/kg), 30 min antes del inicio de la sesión de ICSS, y una inyección de cocaína (10 mg/kg) 10 min antes del inicio de la sesión de ICSS.

Para determinar si MPEP atenúa la duración de los efectos de disminución del umbral de la cocaína, las ratas se inyectaron primero con cualquiera agua estéril o MPEP (3mg/kg), luego 20 min más tarde con solución salina o cocaína (10 mg/kg), 10 min antes del inicio de la primera sesión de ICSS. Las ratas recibieron todas las inyecciones de acuerdo con un diseño de cuadrado Latino intra-sujetos, de tal manera que cada rata recibió las cuatro posibles combinaciones de fármacos (agua-solución salina; agua-cocaína; MPEP-solución salina; MPEP-cocaína). Los umbrales de ICSS luego fueron evaluados 10, 40, 70 y 100 min después de la segunda inyección (solución salina o cocaína). Se dejó transcurrir un periodo de 72 h entre cada inyección diaria en el diseño de cuadrado Latino, durante el cual los umbrales diarios de ICSS continuaron siendo evaluados, para asegurar que los umbrales de ICSS regresaron a niveles basales de pre-inyección antes de la siguiente administración del fármaco.

Experimento 3.4: Efectos del antagonista de mGluR2/3 en la auto-administración de la nicotina bajo una programación de proporción fija.

Previamente, se demostró que el antagonista del receptor metabotrópico de glutamato del Grupo II, LY341495 atenúa la abstinencia de la nicotina, según se mide mediante la disminución de elevaciones en los umbrales de ICSS durante la abstinencia espontánea de la nicotina en las ratas (Kenny et al., 2003c). Para examinar si los receptores mGlu2/3 también juegan un papel en la regulación de las acciones de refuerzo de nicotina, examinamos si LY341495 disminuyó la auto-administración de la nicotina bajo una programación de refuerzo FR. Después del entrenamiento en el paradigma de la auto-administración de la nicotina, como se describe anteriormente, las ratas

fueron inyectadas con LY341495 (0, 0.1, 0.5, 1, 3 o 5 mg/kg) de acuerdo con un diseño de cuadrado Latino intra-sujetos, y la sesión diaria de la auto-administración de la nicotina se inició 30 min más tarde. Se dejó un mínimo de 48 h entre cada inyección en el diseño de cuadrado Latino, durante el cual la ratas tuvieron su sesión diaria de auto-administración de la nicotina, para asegurar que las tasas de la respuesta de la nicotina regresen a los valores basales de pre-inyección antes de la siguiente administración de LY341495.

Experimento 3.5: Los efectos de la combinación de fármacos LY341495 y MPEP en la auto-administración de la nicotina bajo una programación FR (evaluación del consumo) y una programación PR (evaluación de la motivación para la administración del fármaco)

Previamente, se demostró que MPEP disminuye la auto-administración de la nicotina bajo una programación FR en las ratas y ratones (Paterson et al., 2003). Los presentes estudios demuestran (los resultados se describen a continuación) que LY341495 disminuyó de manera similar la auto-administración de la nicotina en las ratas bajo una programación FR. Por lo tanto, se planteó la hipótesis que la inhibición simultánea de los receptores mGlu5 y mGlu2/3, mediante MPEP y LY341495 respectivamente, pueden tener efectos aditivos inhibidores en la auto-administración de la nicotina en las ratas. Aquí hemos demostrado (los resultados descritos a continuación) que LY341495 (0.5 mg/kg) disminuyó la auto-administración de la nicotina por aproximadamente 35 por ciento. Por lo tanto: 1) inyectamos las ratas con esta dosis de LY341495 (0.5 mg/kg), en combinación con una dosis de MPEP (1 mg/kg) demostrando previamente que no tienen efectos en la auto-administración de la nicotina (Paterson et al., 2003) o de la cocaína (los resultados presentes del Experimento 1 reportado en este documento), y se evaluó el comportamiento de auto-administración de la nicotina bajo una programación FR de refuerzo (pretratamiento de 30 minutos); 2) inyectamos las ratas (pretratamiento de 30 min) también con una dosis de LY341495 (1 mg/kg) que se demostró que no tiene efectos en la auto-administración de la nicotina cuando se administra solo en combinación con 1 mg/kg de MPEP (también se demostró que esta dosis de MPEP no tiene efecto en la auto-administración de la nicotina cuando se administra solo) y se evalúa los efectos de este tratamiento de combinación de fármacos en la auto-administración de la nicotina; y 3) por último, inyectamos las ratas con el tratamiento de combinación de fármacos de 1 mg/kg de LY341494 y 9 mg/kg de MPEP (la dosis de MPEP que disminuye la auto-administración de la nicotina cuando se administra por si solo; Paterson et al. 2003) y examinamos los efectos en la auto-administración de la nicotina bajo una programación de refuerzo de proporción progresiva (pretratamiento de 30 min).

Análisis estadísticos

Durante la fase de incremento escalonado del experimento de auto-administración de cocaína, el número de respuestas de cocaína en ratas ShA y LgA durante los 23 días antes de la primera inyección de MPEP se analizó por análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas de dos factores. Durante la fase de tratamiento con MPEP, el cambio de porcentaje del número de respuestas de cocaína basales se calculó por la expresión del número de respuestas de cocaína después del tratamiento con MPEP como un porcentaje del número de respuestas de cocaína basales. Para los experimentos de ICSS, la media de los umbrales brutos y las latencias de respuesta (\pm SEM) se presentan para cada experimento en la sección de resultados. Para todos los experimentos de ICSS, la variación del porcentaje del umbral de recompensa basal se calculó por la expresión de las puntuaciones del umbral bruto influenciadas por el fármaco como un porcentaje de los umbrales basales. Los umbrales basales fueron la media de los umbrales obtenidos en los tres días antes de la primera inyección de MPEP. Para el primer experimento de ICSS (los efectos de MPEP en la disminución del umbral inducido por la cocaína), el porcentaje de las puntuaciones basales fue sometida a ANOVA de dos factores de medidas repetidas, con dosis de MPEP (1-9 mg/kg) y dosis de cocaína (0 o 10 mg/kg) como los dos factores intra-sujetos. Para el segundo experimento de ICSS (los efectos de MPEP sobre la duración de la disminución del umbral inducido por la cocaína), el porcentaje de las puntuaciones basales fue sometido a ANOVA de tres factores de medidas repetidas, con MPEP (0 o 3 mg/kg), cocaína (0 o 10 mg/kg) y tiempo después de la segunda inyección (10, 40, 70 y 100 min), como los tres factores intra-sujetos. Para todos los experimentos de ICSS, los datos de latencia de respuesta fueron analizados de la misma manera como los datos de umbral. El número de respuestas de nicotina basales fue la media del número de respuestas de nicotina en los cinco días antes de la primera inyección de LY341495. Durante la fase de tratamiento con LY341495, el porcentaje cambio de número de respuestas de nicotina basales se calculó por la expresión del número de respuestas de nicotina después del tratamiento con LY341495 como un porcentaje del número de respuestas de nicotina basales. Los datos de la proporción progresiva fueron expresados como la más alta proporción alcanzada (i.e., punto de quiebre) o número de infusiones obtenidas (los datos se expresan como los valores base). Después los efectos estadísticamente significantes en los ANOVAs, las comparaciones *post-hoc* entre las medias fueron realizadas con el test LSD de Fisher. El nivel de significancia se fijó en .05.

Resultados

Experimento 3.1: Los efectos de administración de MPEP en la auto-administración de cocaína bajo una programación de refuerzo de Proporción Fija

Como se puede ver en la Fig. 9A, el número de respuestas de cocaína aumentó progresivamente en ratas LgA en comparación con las ratas ShA durante la fase de incremento escalonado. Este efecto se reflejó en un efecto principal estadísticamente significativo de *acceso Diario* (1 o 6 h) ($F_{(1,21)}=10.96$, $p<0.01$), un efecto principal significativo de los *Días de tratamiento* ($F_{(12,252)}=10.96$, $p<0.001$), y una interacción significativa *Acceso x Días* ($F_{(12,252)}=1.69$, $p<0.05$). MPEP (1-9 mg/kg) disminuyó la auto-administración de cocaína en ratas ShA y LgA ($F_{(4,48)}=9.34$, $p<0.001$) (Fig. 9B). El análisis *post-hoc* demostró que 3 ($p<0.05$), 6 ($p<0.01$) y 9 ($p<0.001$) mg/kg de MPEP disminuyeron significativamente la respuesta de la cocaína en ratas ShA (Fig. 9B). El análisis *post-hoc* demostró que solamente la dosis más alta de MPEP (9 mg/kg) disminuyó significativamente la respuesta de la cocaína en ratas LgA ($p<0.01$) (Fig. 9B). Sin embargo, no hubo interacción Dosis x Acceso ($F_{(12,252)}=0.97$, N.S.). Cuando la respuesta de la cocaína para las ratas ShA y LgA se colapsó, MPEP disminuyó significativamente la respuesta de la cocaína ($F_{(4,52)}=9.36$, $p<0.001$) (Fig. 9C), y el análisis *post-hoc* demostró que 3 ($p<0.01$), 6 ($p<0.01$) y 9 ($p<0.001$) mg/kg de MPEP disminuyeron significativamente la respuesta de la cocaína en el grupo colapsado (Fig. 9C).

Experimento 3.2: El efectos de MPEP on auto-administración de la cocaína y la nicotina bajo una programación de refuerzo de Proporción Progresiva.

Un ANOVA de dos vías con dosis de MPEP y refuerzo como los dos factores revelaron un efecto de interacción significativo de los dos factores [$F_{(6,48)}=3.95$, $p<.01$], un efecto principal de MPEP [$F_{(3,48)}=3.95$; $p < .01$] y ningún efecto principal significativo del refuerzo [$F_{(2,16)}=1.41$, $p = 0.27$]. Como se puede ver en la Fig. 10, MPEP (1-9 mg/kg) disminuyó la respuesta para la cocaína (efecto significativo de MPEP en un ANOVA de seguimiento de una vía después de un efecto de interacción significativo en el ANOVA completo: $F_{(3,15)}=12.76$; $p < .001$) y la nicotina (efecto significativo de MPEP en un ANOVA de seguimiento de una vía después de un efecto de interacción significativo en el ANOVA completo: $F_{(3,18)}=11.28$; $p<.001$) bajo una programación de refuerzo de proporción progresiva, mientras que no tiene efecto estadísticamente significativo en la respuesta al alimento (sin efecto de MPEP en la respuesta al alimento en un ANOVA de seguimiento de una vía después de un efecto de interacción significativo en el ANOVA completo: $F_{(3,15)}=2.84$; $p = 0.07$). Debido a que las programaciones de proporción progresiva de refuerzo proporcionan una medida de una "motivación" de los animales para obtener la droga, estos datos demuestran que MPEP disminuyó la motivación de las ratas para obtener la cocaína o la nicotina sin afectar su motivación al alimento, demostrando así la especificidad de los efectos.

Experimento 3.3: Los efectos de MPEP en la reducción inducida por la cocaína de los umbrales de ICSS

Como se puede ver en la Fig. 11A, la cocaína (10 mg/kg) redujo significativamente los umbrales de ICSS ($F_{(1,8)}=98.21$, $p<0.001$). En contraste, MPEP elevó significativamente los umbrales de ICSS ($F_{(4,32)}=8.22$, $p<0.001$), y el análisis *post-hoc* demostró que 6 ($p<0.05$) y 9 ($p<0.01$) mg/kg de MPEP elevó significativamente los umbrales de ICSS. No hubo interacción *cocaína x MPEP* ($F_{(4,32)}=0.75$, N.S.). Adicionalmente el análisis basándose en nuestra hipótesis *a-priori* reveló que los umbrales de ICSS se elevaron significativamente en las ratas tratadas con cocaína que recibieron previamente MPEP (9 mg/kg) en comparación con las ratas tratadas con cocaína que recibieron la inyección del vehículo ($p<0.05$) (Fig. 11 A). Sin embargo, los umbrales de ICSS en las ratas tratadas con cocaína que recibieron previamente MPEP (9 mg/kg) incluso se redujeron significativamente en comparación con las rats tratadas con solución salina, pretratadas con vehículo ($p<0.001$). La cocaína (10 mg/kg) disminuyó significativamente las latencias de respuesta de ICSS ($F_{(1,8)}=42.13$, $p<0.001$) (Fig. 11B). En contraste, MPEP aumentó significativamente las latencias de respuesta ($F_{(4,32)}=2.8$, $p<0.05$). Adicionalmente, el análisis demostró que solamente la dosis más alta de MPEP (9 mg/kg) aumentó significativamente las latencias de respuesta ($p<0.05$) (Fig. 11B). No hubo interacción *cocaína x MPEP* ($F_{(4,32)}=2.16$, N.S.).

Como se puede ver en la Fig. 12A, la cocaína (10 mg/kg) redujo significativamente los umbrales de ICSS ($F_{(1,8)}=62.73$, $p<0.001$). Esta reducción inducida por la cocaína en los umbrales de ICSS fue dependiente del tiempo; interacción *cocaína x tiempo* ($F_{(3,24)}=30.75$, $p<0.001$). El análisis *post-hoc* reveló que los umbrales de ICSS se redujeron significativamente en las ratas tratadas con cocaína, pretratadas con vehículo, a 10 ($p<0.001$) y 40 ($p<0.001$) min después de la inyección de cocaína en comparación con las ratas tratadas con solución salina pretratadas con vehículo. MPEP (3 mg/kg) no tuvo efecto sobre los umbrales de ICSS en ningún punto de tiempo ($F_{(1,8)}=0.002$, N.S.), y no hubo interacción *cocaína x MPEP x tiempo* ($F_{(3,24)}=1.02$, N.S.). El análisis *post-hoc* reveló que los umbrales de ICSS se redujeron significativamente en las ratas tratadas con cocaína, pretratadas con MPEP, a 10 ($p<0.001$) y 40 ($p<0.001$) min después de la inyección de cocaína en comparación con las ratas tratadas con solución salina-vehículo. La cocaína disminuyó significativamente las latencias de respuesta de ICSS ($F_{(1,8)}=12.65$, $p<0.01$) (Fig. 12B). Esta reducción inducida por la cocaína en las latencias de respuesta también fue dependiente del tiempo; interacción *cocaína x tiempo* ($F_{(3,24)}=6.62$, $p<0.01$). El análisis *post-hoc* reveló que las latencias de respuesta se disminuyeron significativamente en las ratas tratadas con cocaína, pretratadas con vehículo, a 10 ($p<0.001$) min después de la inyección de cocaína en comparación con las ratas tratadas con solución salina pretratadas con vehículo. MPEP (3 mg/kg) no tuvo efecto en las latencias de respuesta en ningún punto de tiempo ($F_{(1,8)}=2.67$, N.S.), y no hubo interacción *cocaína x MPEP x tiempo* ($F_{(3,24)}=0.14$, N.S.). El análisis *post-hoc* reveló que los umbrales de ICSS se redujeron significativamente en las ratas tratadas con cocaína, pretratadas con MPEP, a 10 ($p<0.001$) min después de la inyección de cocaína en comparación con las ratas tratadas con solución salina-vehículo.

Experimento 3.4: Efectos del antagonista mGluR2/3 en la auto-administración de la nicotina bajo una programación de proporción fija.

Como se ve en la Fig. 13, LY341495 (0.1-5 mg/kg) disminuyó la auto-administración de la nicotina bajo una programación FR ($F_{(6,35)}=3.75$, $p<0.01$). El análisis *post-hoc* demostró que 0.1 ($p<0.01$), 0.5 ($p<0.05$), 3 ($p<0.01$) y 5 ($p<0.01$) mg/kg de LY341495 disminuyeron significativamente la respuesta con cocaína (Fig. 13).

Experimento 3.5: Los efectos de la combinación de las drogas LY341495 y MPEP en la auto-administración de la nicotina bajo una programación FR y una programación PR.

Como se ve en la Fig. 14, una combinación de LY341495 (0.5 mg/kg) y una dosis de MPEP (1 mg/kg), como se muestra anteriormente en el Ejemplo 2, no tienen efectos en la auto-administración de la nicotina (Ver también, Paterson et al., 2003) o de la cocaína, disminuyó significativamente la respuesta para la nicotina ($F_{(2,17)}=8.6$, $p<0.01$).

El análisis *post-hoc* demostró que LY341495 (0.5 mg/kg) solo ($p<0.05$), y la combinación de LY341495 (0.5 mg/kg) y MPEP (1 mg/kg) ($p<0.01$) disminuyó significativamente la auto-administración de la nicotina. La combinación de LY341495 (0.5 mg/kg) y MPEP (1 mg/kg) disminuyó la auto-administración de la nicotina por una magnitud mayor de LY341495 (0.5 mg/kg) solo, aunque este efecto solo falló para alcanzar la significancia estadística ($p=0.053$). De manera similar, una dosis de LY341495 (1 mg/kg), se combina con una dosis de comportamiento inactivo de MPEP (1 mg/kg) también disminuyó la auto-administración de la nicotina (Fig. 15). Por último, los datos adicionales (Fig. 16) indicaron que la combinación de 9 mg/kg de MPEP junto con 1 mg/kg de LY341494, disminuyó significativamente la auto-administración de la nicotina bajo una programación de refuerzo de proporción progresiva.

Discusión

Las observaciones recientes de nuestro laboratorio han demostrado que repetidos accesos extendidos (6 h) de auto-administración de cocaína dio lugar a un aumento progresivo o "incremento escalonado" en el consumo de cocaína diario en ratas LgA (Ahmed and Koob, 1998; Ahmed et al., 2002). En contraste, las ratas ShA con acceso restringido (1 h) a la auto-administración de cocaína mantuvo un patrón estable de consumo de cocaína diario. Los datos actuales demuestran que el antagonista del receptor mGlu5 MPEP, disminuyó el consumo de cocaína de forma similar en las ratas con ratas ShA y LgA, lo que sugiere que el bloqueo de los receptores mGluR5 puede disminuir el consumo de fármacos en individuos drogo-dependientes y no-drogo-dependientes. Previamente, se demostró que MPEP disminuye la auto-administración de la cocaína en ratones control de tipo salvaje (Chiamulera et al., 2001), y los ratones modificados genéticamente en los cuales el mGlu5 suprimió la falla para adquirir el comportamiento de auto-administración de la cocaína, a pesar de que la respuesta de refuerzo de alimento no se alteró en estos ratones (Chiamulera et al., 2001). De manera similar, el Ejemplo 2 anterior ilustra que MPEP disminuye la auto-administración de la nicotina en las ratas y los ratones. Por lo tanto, los datos en este Ejemplo son consistentes con un papel importante de los receptores mGlu5 en la regulación del comportamiento de auto-administración de la cocaína y de la nicotina en ambos individuos drogo-dependientes y no-drogo-dependientes. Sin embargo, MPEP disminuyó el consumo de cocaína por una magnitud similar en ratas ShA y LgA. Por lo tanto, es poco probable que el incremento escalonado en la ingesta de la cocaína observado en las ratas LgA, se asociara con las alteraciones en la regulación del receptor mGlu5 del comportamiento de auto-administración de la cocaína.

Se cree que las acciones hedónicas de la cocaína desempeñan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento del comportamiento de auto-administración de la cocaína (Stewart et al., 1984; Kenny et al., 2003a). La reducción inducida por la cocaína de los umbrales de ICSS, se considera una medida precisa de las acciones hedónicas de la cocaína. Curiosamente, las dosis de MPEP (1-9 mg/kg) que disminuyen la auto-administración de cocaína no atenuaron la magnitud de la reducción en los umbrales de ICSS observados después de la administración sistémica de la cocaína. De manera similar, MPEP (3 mg/kg) no atenuó la duración del tiempo que la cocaína redujo los umbrales de ICSS. Debido a que la reducción inducida por la cocaína al los umbrales de ICSS es una medida precisa de la facilidad, inducida por la cocaína, de la función de recompensa del cerebro, estas observaciones sugieren que MPEP disminuyó el consumo de cocaína a pesar de que el impacto hedónico de la cocaína se mantuvo intacto. Es importante señalar que las dosis más altas de MPEP (6-9 mg/kg) solo elevaron los umbrales de ICSS, lo que sugiere que los receptores mGlu5 regulan positivamente la función de recompensa del cerebro basal. Sin embargo, a las dosis bajas de MPEP (3 mg/kg), que no tuvieron efecto en los umbrales de ICSS solo disminuyeron significativamente el comportamiento de auto-administración de la cocaína. Por lo tanto, es poco probable que MPEP disminuya el comportamiento de auto-administración de la cocaína al disminuir el valor basal de la función de recompensa del cerebro y por ello induce un estado de comportamiento aversivo. En general, los datos en este Ejemplo sugieren que MPEP disminuyó la auto-administración de cocaína (i.e., consumo) por un mecanismo independiente de las acciones hedónicas de la cocaína.

Una posible explicación para las observaciones anteriores es que MPEP disminuyó la "motivación" de las ratas para auto-administrarse cocaína, pero no alteró los incrementos inducidos por la cocaína en la función de recompensa del cerebro (i.e., inducida por la euforia de la cocaína). Para probar esta posibilidad, examinamos si MPEP disminuiría la respuesta de la cocaína y la nicotina bajo las programaciones de refuerzo de proporción progresiva (PR). Las

programaciones PR proporcionan una medida de una “motivación” de los animales para obtener una droga de abuso. Curiosamente, MPEP redujo significativamente el punto de quiebre de la cocaína y la nicotina bajo una programación de refuerzo PR. Esta observación sugiere que MPEP disminuyó la motivación de las ratas para obtener la cocaína y la nicotina, y por lo tanto conduce a una disminución en el consumo del fármaco.

5 Después, examinamos si el bloqueo de los receptores mGlu2/3 disminuiría la auto-administración de la nicotina en las ratas de forma similar al bloqueo de los receptores mGlu5. El Ejemplo 1 anterior, ilustra que el bloqueo de los receptores mGlu2/3 por la administración del antagonista del receptor mGlu2/3 LY341495, atenúa los aspectos similares a la depresión por abstinencia de la nicotina en las ratas. Los datos actuales demostraron que LY341495, un antagonista en los receptores mGlu2/3, disminuyó el consumo de la nicotina en las ratas, lo que sugiere que el
10 bloqueo de los receptores mGlu2/3 disminuyó los efectos de refuerzo de la nicotina. Lo más interesante, la coadministración de una dosis de MPEP (1 mg/kg) que no tiene efectos en la auto-administración de la cocaína o la nicotina potenció los efectos inhibidores de LY341495 (0.5 mg/kg o 1 mg/kg) en la auto-administración de la nicotina. Adicionalmente, la combinación de 9 mg/kg de MPEP disminuyó la auto-administración de la cocaína o de la nicotina, cuando se administra solo, cuando se combina con 1 mg/kg de LY341495, también disminuyó la auto-
15 administración de la nicotina bajo una programación de refuerzo de proporción progresiva, y el efecto fue mayor que el de cualquier droga sola, demostrando claramente una potenciación de estos efectos. Estas observaciones sugieren que el bloqueo simultáneo de los receptores mGlu2/3 y mGlu5, puede tener una mejor eficacia en el tratamiento del fármaco que el bloqueo del subtipo del receptor solo, y que dicho bloqueo simultáneo de los receptores mGlu2/3 y mGlu5 disminuye tanto el consumo del fármaco como la motivación para participar en
20 comportamientos para tomar la droga.

Adicionalmente, como se ilustra en el Ejemplo 1 anterior, el bloqueo de los receptores mGlu2/3 invierte los aspectos similares a la depresión afectiva de la abstinencia de la nicotina. Por lo tanto, los tratamientos farmacológicos con acciones antagonistas duales en los receptores mGlu2 y/o mGlu3, y mGlu5: 1) disminuye el consumo de las drogas de abuso, tales como nicotina y cocaína a una extensión mayor que el bloqueo ya sea de
25 solo un receptor y 2) revertir los aspectos afectivos de la abstinencia a las drogas, y posiblemente de la drogodependencia. Estos efectos, pueden contribuir tanto, en el consumo del fármaco como en la abstinencia a las drogas para aumentar las tasas de abstinencia entre los fumadores de tabaco, y los consumidores y abusadores de las drogas.

REFERENCIAS citadas en el Ejemplo 1:

- 30 Ahmed SH, Kenny PJ, Koob GF, Markou A (2002), *Nat Neurosci* 5:625-626.
- Benowitz NL (1988), *N Engl J Med* 319:1318-1330.
- Bonci A, Grillner P, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G (1997), *Eur J Neurosci* 9:2359-2369.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000), *J Neurochem* 75:889-907.
- 35 Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F, Conquet F (2001), *Nat Neurosci* 4:873-874.
- David V, Durkin TP, Cazala P (1998), *Eur J Neurosci* 10:1394-1402.
- Di Chiara G (2000), *Eur J Pharmacol* 393:295-314.
- Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A (1998), *Nature* 393:76-79.
- 40 Erhardt S, Mathe JM, Chergui K, Engberg G, Svensson TH (2002), *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365: 173-180.
- Fu Y, Matta SG, Gao W, Brower VG, Sharp BM (2000), *J Pharmacol Exp Ther* 294:458-465.
- Fundyus ME, Coderre TJ (1997), *Br J Pharmacol* 121:511-514.
- Giorgetti M, Hotsenpiller G, Froestl W, Wolf ME (2002), *Neuroscience* 109:585-595.
- Harrison AA, Liem YT, Markou A (2001), *Neuropsychopharmacology* 25:55-71.
- 45 Harrison AA, Gasparini F, Markou A (2002), *Psychopharmacology* 160:56-66.

- Helton DR, Tizzano JP, Monn JA, Schoepp DD, Kallman MJ (1997), *Neuropharmacology* 36:1511-1516.
- Hildebrand BE, Nomikos GG, Bondjers C, Nisell M, Svensson TH (1997), *Psychopharmacology* 129:348-356.
- Hildebrand BE, Panagis G, Svensson TH, Nomikos GG (1999), *Neuropsychopharmacology* 21:560-574.
- Hu XT, White FJ (1996), *Synapse* 23:208-218.
- 5 Kalivas PW (1993), *Brain Res Brain Res Rev* 18:75-113.
- Kalivas PW, Stewart J (1991), *Brain Res Brain Res Rev* 16:223-244.
- Kenny PJ, Markou A (2001), *Pharmacol Biochem Behav* 70:531-549.
- Keys AS, Mark GP, Emre N, Meshul CK (1998), *Synapse* 30:393-401.
- Kornetsky C, Esposito RU (1979), *Fed Proc* 38:2473-2476.
- 10 Lee KJ, Kim DH, Shim IS, Choi SH, Min BH, Chun BG, Shin KH (2001), *Soc Neurosci Abstr* 27: 599.
- Lu W, Wolf ME (1999), *Synapse* 32:119-131.
- Macey DJ, Froestl W, Koob GF, Markou A (2001), *Neuropharmacology* 40:676-685.
- Malin DH, Lake JR, Newlin-Maultsby P, Roberts LK, Lanier JG, Carter VA, Cunningham JS, Wilson OB (1992), *Pharmacol Biochem Behav* 43:779-784.
- 15 Malin DH, Lake JR, Carter VA, Cunningham JS, Hebert KM, Conrad DL, Wilson OB (1994), *Psychopharmacology* 115:180-184
- Mansvelder HD, McGehee DS (2000), *Neuron* 27:349-357.
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002), *Neuron* 33:905-919.
- Manzoni OJ, Williams JT (1999), *J Neurosci* 19:6629-6636.
- 20 Markou A, Koob GF (1992), *Physiol Behav* 51:111-119.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998), *Neuropsychopharmacology* 18:135-174.
- Paxinos G, Watson CH (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London Academic Press, London, UK.
- Pennartz CM, Boeijinga PH, Lopes da Silva FH (1990), *Brain Res* 529:30-41.
- Picciotto MR (1998), *Drug Alcohol Depend* 51:165-172.
- 25 Picciotto MR, Corrigall WA (2002), *J Neurosci* 22:3338-3341.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996), *Nature* 382:255-257.
- Rasmussen K (1995), *Neuropsychopharmacology* 13:295-300.
- Schilström B, Nomikos GG, Nisell M, Hertel P, Svensson TH (1998), *Neuroscience* 82:781-789.
- Schoepp DD (2001), *J Pharmacol Exp Ther* 299:12-20.
- 30 Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ (2002), *J Neurosci*. 22:3663-3672.
- Suaud-Chagny MF, Chergui K, Chouvet G, Gonon F (1992), *Neuroscience* 49:63-72. Taylor JR, Punch LJ, Elsworth JD (1997), *Psychopharmacology* 138:133-142.

Vandergriff J, Rasmussen K (1999), *Neuropharmacology* 38:217-222.

Watkins SS, Stinus L, Koob GF, Markou A (2000), *J Pharmacol Exp Ther* 292:1053-1064. Wigmore MA, Lacey MG (1998), *Br J Pharmacol* 123:667-674.

Xi Z, Baker DA, Shen H; Carson DS, Kalivas PW (2002), *J Pharmacol Exp Ther* 300:162-171.

- 5 Xi Z, Shen H, Carson D, Baker DA, Kalivas PW (2001), *Soc Neurosci Abstr* 27: 2596. Zhang T, Feng Y, Rockhold RW, Ho IK (1994), *Life Sci* 55:PL25-PL31.

Referencias para el Ejemplo 2

Battaglia G, Bruno V, Pisani A, Centonze D, Catania MV, Calabresi P, Nicoletti F (2001), *Mol Cell Neurosci* 17: 1071-1083

- 10 Battaglia G, Fornai F, Busceti CL, Aloisi G, Cerrito F, De Blasi A, Melchiorri D, Nicoletti F (2002), *J Neurosci* 22(6): 2135-2141

Breyse N, Baunez C, Spooren W, Gasparini F, Amalric M (2002), *J Neurosci* 22(13):5669-5678

Caine SB, Negus SS, Mello NK, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A, Borrelli E (2002), *J Neurosci* 22(7):2977-2988

- 15 Cartmell J, Schoepp DD (2000), *J Neurochem* 75:889-907

Chapman AG, Nanan K, Williams M, Meldrum BS (2000), *Neuropharmacology* 39:1567-1574

Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F, Conquet F (2001), *Nature Neurosci* 4(9):873-874

Conn PJ, Pin J-P (1997), *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-37

- 20 Corrigan WA, Coen KM (1991), *Psychopharmacology* 104:171-176

Corrigan WA, Coen KM, Zhang J, Adamson L (2002), *Psychopharmacology* 160:198-205 Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W (2001), *Behav Brain Res* 118(1):61-5

David HN, Abiraini JH (2001), *Eur J Neurosci* 13:2157-2164

Dewey SL, Brodie JD, Gerasimov M, Horan B, Gardner EL, Ashby CR Jr. (1999), *Synapse* 31:76-86

- 25 Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Fratta W (2002), *Alcohol* 37(5):495-498

File SE, Kenny PJ, Ouagazzal A-M (1998), *Behav Neurosci* 112:1423-1429

Gasparini F, Lingenhohl K, Stoehr N, Flor PJ, Heinrich M, Vranesic I, Biollaz M, Allgeier H, Heckendorn R, Urwyler S, Varney MA, Johnson EC, Hess SD, Rao SP, Sacaan AI, Santori EM, Velicelebi G, Kuhn R (1999), *Neuropharmacology* 38:1493-1503

- 30 Ghasemzadeh MB, Nelson LC, Lu X-Y, Kalivas PW (1999), *J Neurochem* 72: 157-165 Goeders NE, McNulty MA, Mirkis S, McAllister KH (1989), *Pharmacol Biochem Behav* 33:859-866

Goeders NE, McNulty MA, Guerin GF (1993), *Pharmacol Biochem Behav* 44:471-474 Goeders NE (1997), *Psychoneuroendocrinology* 22(4):237-259

Harrison AA, Gasparini F, Markou A (2002), *Psychopharmacology* 160:56-66

- 35 Henry SA, Lehmann-Masten V, Gasparini F, Geyer MA, Markou A (2002), *Neuropharmacology*. In Press.

Holscher C, Gigg J, O'Mara SM (2001), *Neurosci Biobehav Rev* 23:399-410

- Irvine EE, Bagnalasta M, Marcon C, Motta C, Tessari M, File SE, Chiamulera C (2001), *Psychopharmacology* 153: 315-320
- Kuzmin A, Semenova S, Zvartau EE, van Ree JM (1996a), *Eur Neuropsychopharmacol* 6:63-68
- Kuzmin A, Semenova S, Ramsey NF, Zvartau EE, van Ree JM (1996b), *Eur J Pharmacol* 295:19-25
- 5 Kuzmin AV, Semenova S, Gerrits MA, Zvartau EE, van Ree JM (1997), *Eur J Pharmacol* 321 (3):265-271
- Kuzmin A, Semenova S, Zvartau E, De Vry J (1999), *Eur Neuropsychopharmacol* 9:197-203 Mansvelde HD, Keath JR, McGehee DS (2002), *Neuron* 33(6):905-919
- Markou A, Paterson NE (2001), *Nic Tob Res* 3:361-373
- Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998), *Eur Neuropsychopharmacol* 8(4):293-296
- 10 McGehee DS, Heath MJS, Gelber S, Devay P, Role LW (1995), *Science* 269:1692-1696 Miner LL, Drago J, Chamberlain PM, Donovan D, Uhl GR (1995), *Neuroreport* 6(17):2314-2316
- Ossowska K, Konieczny J, Wolfarth S, Wieronska J, Pilc A (2001), *Neuropharmacology* 41:413-420
- Paterson NE, Markou A (2002), *Synapse* 44:252-253
- Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1990), *Brain Res* 514:22-26
- 15 Picciotto MR, Corrigan WA (2002), *J Neurosci* 22(9):3338-3341
- Ramsay NF and Van Ree JM (1993), *Brain Res.* 608:216-22
- Reid MS, Fox L, Ho LB, Berger SP (2000), *Synapse* 35(2):129-136
- Sarnyai Z, Shaham Y, Heinrichs SC (2001), *Pharmacol Rev* 53(2):209-243
- 20 Schilström B, Fagerquist MV, Zhang X, Hertel P, Panagis G, Nomikos GG, Svensson TH (2000), *Synapse* 38(4): 375-383
- Schoepp DD (2001), *J Pharmacol Exp Ther* 299:12-20
- Schulz B, Fendt M, Gasparini F, Lingenhohl K, Kuhn R, Koch M (2001), *Neuropharmacology* 41:1-7
- Semenova S, Kuzmin A, Zvartau E (1995), *Pharmacol Biochem Behav* 50(1):17-21 Semenova S, Danysz W, Bespalov A (1999), *Eur J Pharmacol* 378(1):1-8
- 25 Shaham Y, Alvares K, Nespors SM and Grunberg NE (1992), *Pharmacol Biochem Behav* 41:615-619
- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N (1993), *Neurosci Lett* 163(1):53-57
- Spooren WPJM, Gasparini F, Bergmann R, Kuhn R (2000a), *Eur J Pharmacol* 406:403-410
- Spooren WPJM, Vassout A, Neijt HC, Kuhn R, Gasparini F, Roux S, Porsolt RD, Gentsch C (2000b), *J Pharmacol Exp Ther* 295:1267-1275
- 30 Spooren WPJM, Gasparini F, Salt TE, Kuhn R (2001), *Trends Pharmacol Sci* 22(7):331-337
- Stolerman IP, Naylor C, Elmer GI, Goldberg SR (1999), *Psychopharmacology* 141(3):297-306.
- Szyndler J, Sienkiewicz-Jarosz H, Maciejak P, Siemiatkowski M, Rokicki D, Członkowska AI, Plaznik A (2001), *Pharmacol Biochem Behav* 69:511-518
- 35 Tatarczyńska E, Klodzińska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Gasparini F, Kuhn R, Pilc A (2001), *Br J Pharmacol* 132:1423-1430

Tallaksen-Greene SJ, Kaatz KW, Romano C, Albin RL (1998), *Brain Res* 780:210-217
 Vezina P, Kim J-H (1999), *Neurosci Biobehav Rev* 23:577-589

Watkins SS, Koob GF, Markou A (2000), *Nicotine Tob Res.* 2(1):19-37

Zhang Y, Loonam TM, Noailles PA, Angulo JA (2001), *Ann N Y Acad Sci* 937:93-120

5 REFERENCIAS citadas en el Ejemplo 3

Chiamulera, C., Epping-Jordan, M.P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., Corsi, M., Orzi, F., Conquet, F., 2001, *Nat Neurosci*, 4, 873-874.

Esposito, R.U., Motola, A.H., Kornetsky, C., 1978, *Pharmacol Biochem Behav*, 8, 437-439.

Frank, R.A., Martz, S., Pommering, T., 1988, *Pharmacol Biochem Behav*, 29, 755-758.

10 Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2003, *Neuropsychopharmacology*, 28, 73-76.

Harrison, A.A., Liem, Y.T. and Markou, A. (2001), *Neuropsychopharmacology*, 25, 55-71.

Kalivas, P.W., Duffy, P., 1998, *J Neurochem*, 70, 1497-1502.

Kenny, P.J., Polis, I., Koob, G.F., Markou, A., 2003b, *Eur J Neurosci*, 17, 191-195.

Kenny PJ, Gasparini F, Markou A. (2003c), *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jun 12 [Epub ahead of print].

15 Kokkinidis, L., McCarter, B.D., 1990, *Pharmacol Biochem Behav*, 36, 463-471.

Laviolette, S.R., van der Kooy, D., 2003, *Psychopharmacology (Berl)*, 166, 306-313.

Mansvelder, H.D., McGehee, D.S., 2000, *Neuron*, 27, 349-357.

Markou, A. and Kenny, P.J. (2002), *Neurotoxicity Research*, 4(4), 297-313.

Markou, A., Koob, G.F., 1992, *Physiol Behav*, 51, 111-119.

20 Markou, A. and Koob, G.F. (1993) Intracranial self-stimulation thresholds as a measure of reward. In: A. Sahgal (Ed.), *Behavioural Neuroscience: A Practical Approach*, vol. 2, IRL Press, Oxford, pp. 93-115.

Markou, A., Kosten, T.R. and Koob, G.F. (1998), *Neuropsychopharmacology*, 18(3), 135-174.

McGeehan, A.J., Olive, M.F., 2003, *Synapse*, 47, 240-242.

Popik, P., Wrobel, M., 2002, *Neuropharmacology*, 43, 1210-1217.

25 Stewart, J., de Wit, H., Eikelboom, R., 1984, *Psychol Rev*, 91, 251-268.

Ungless, M.A., Whistler, J.L., Malenka, R.C., Bonci, A., 2001, *Nature*, 411, 583-587.

Wolf, M.E., 2003, *Methods Mol Med*, 79, 13-31.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación que comprende

(a) al menos un ingrediente activo seleccionado de un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 2 y un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 3, y

5 (b) al menos un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 5,

en la cual los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y

opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable;

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno adictivo.

10 2. Uso de una combinación que comprende

(a) al menos un ingrediente activo que muestra actividad antagonista contra el receptor metabotrópico de glutamato 2 y el receptor metabotrópico de glutamato 3, y

(b) al menos un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 5,

15 en la cual los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y

opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable;

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno adictivo.

3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la combinación es una preparación combinada o una composición farmacéutica.

20 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el trastorno adictivo es la adicción a la nicotina, adicción al alcohol, adicción a los opiáceos, adicción a las anfetaminas, adicción a las metanfetaminas, o adicción a la cocaína.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el trastorno adictivo es la adicción a la nicotina.

25 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el trastorno adictivo es la adicción a la cocaína.

7. Una combinación que comprende

(a) al menos un ingrediente activo seleccionado de un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 2 y un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 3, y

30 (b) al menos un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 5,

en la cual los ingredientes activos están presentes en cada caso, en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y

opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

8. Una combinación que comprende

35 (a) al menos un ingrediente activo que muestra actividad antagonista contra el receptor metabotrópico de glutamato 2 y el receptor metabotrópico de glutamato 3, y

(b) al menos un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato 5,

en la cual los ingredientes activos están presentes en cada caso, en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y

opcionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 **9.** Combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, la cual es una preparación combinada o una composición farmacéutica.

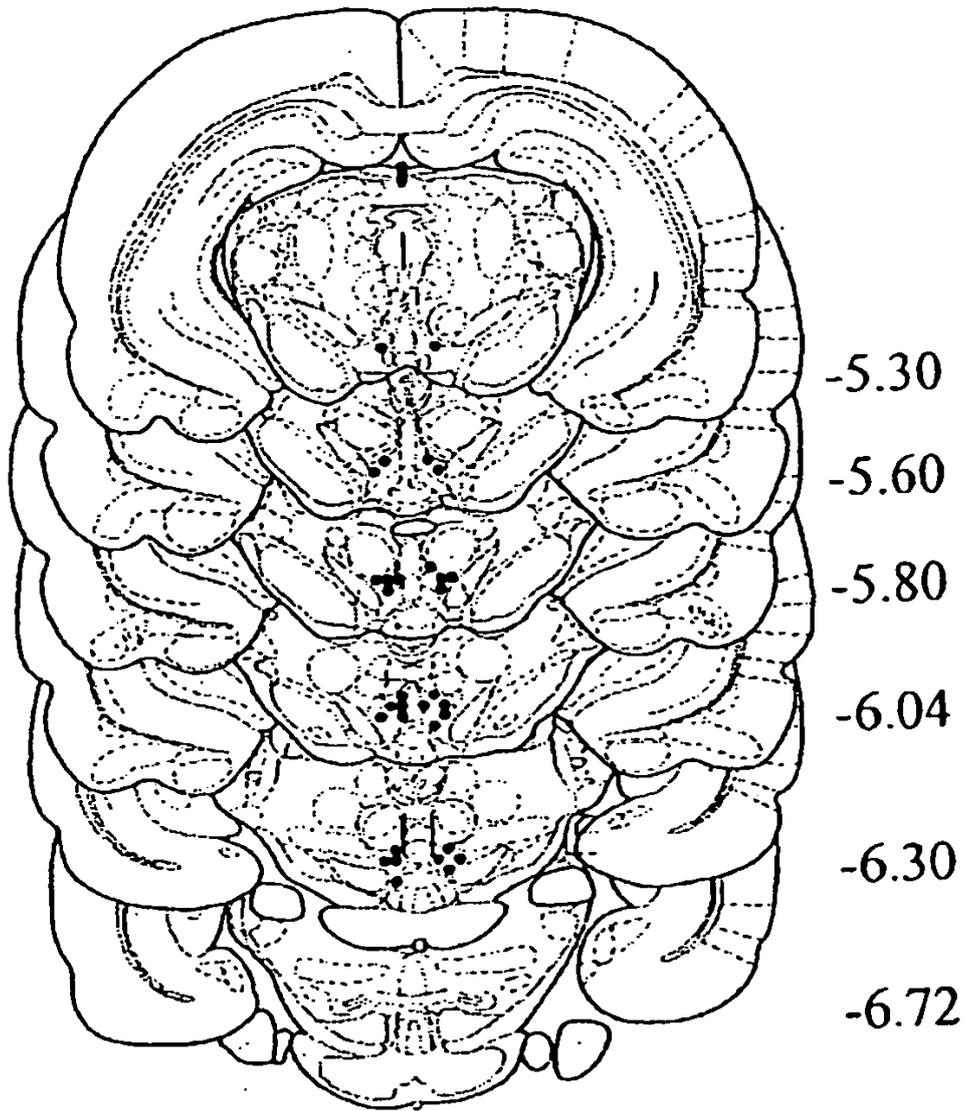


FIGURA 1

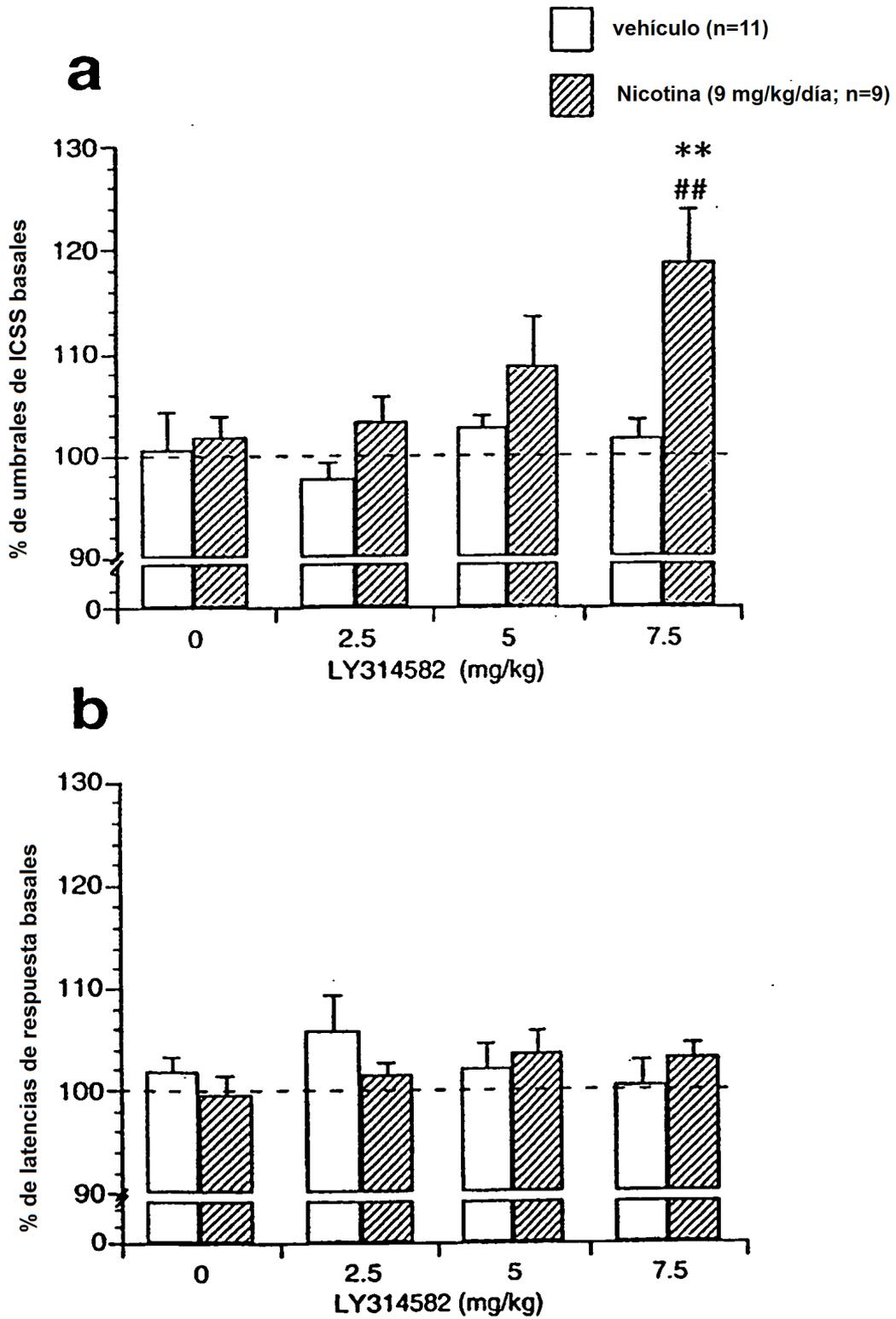


FIGURA 2

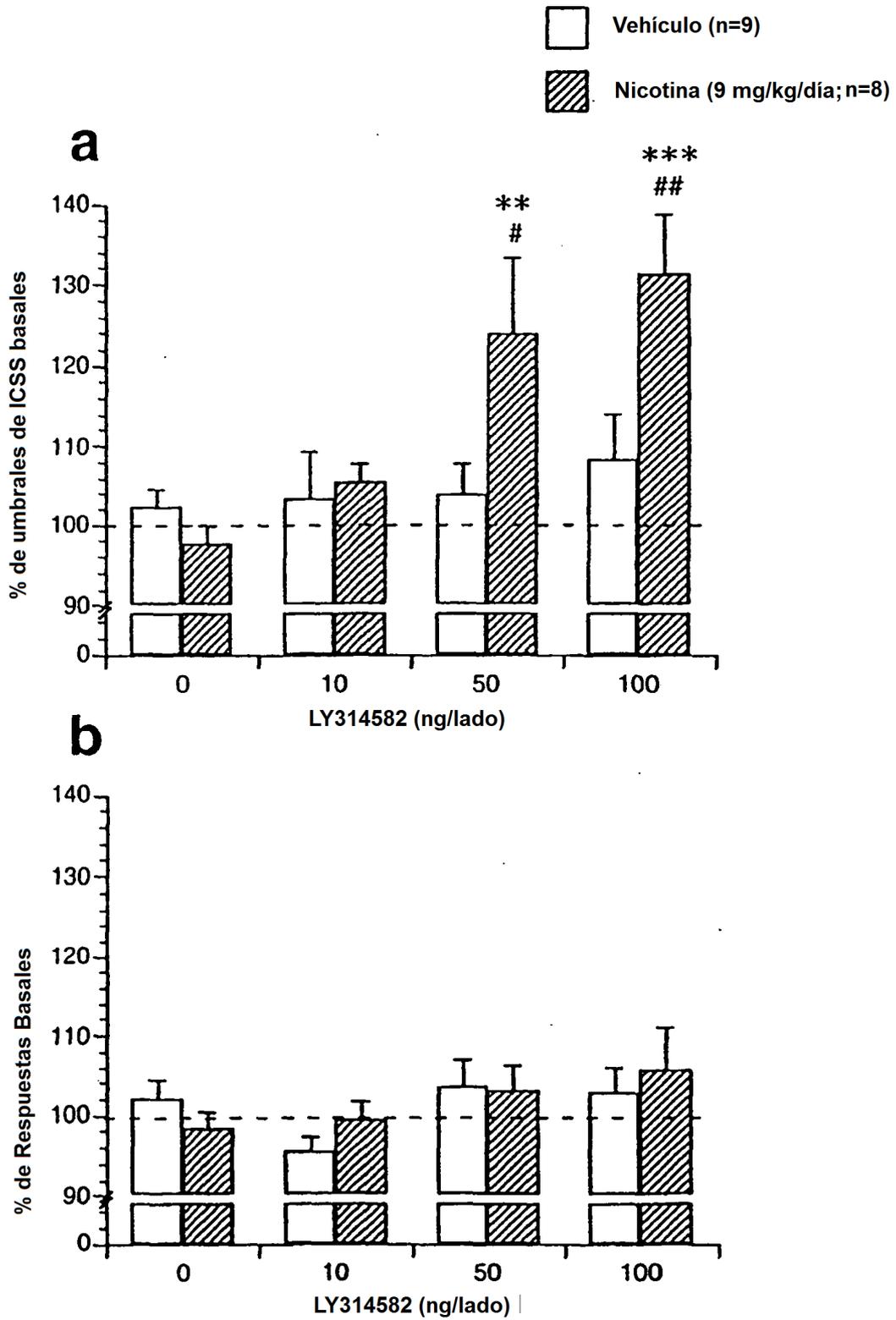


FIGURA 3

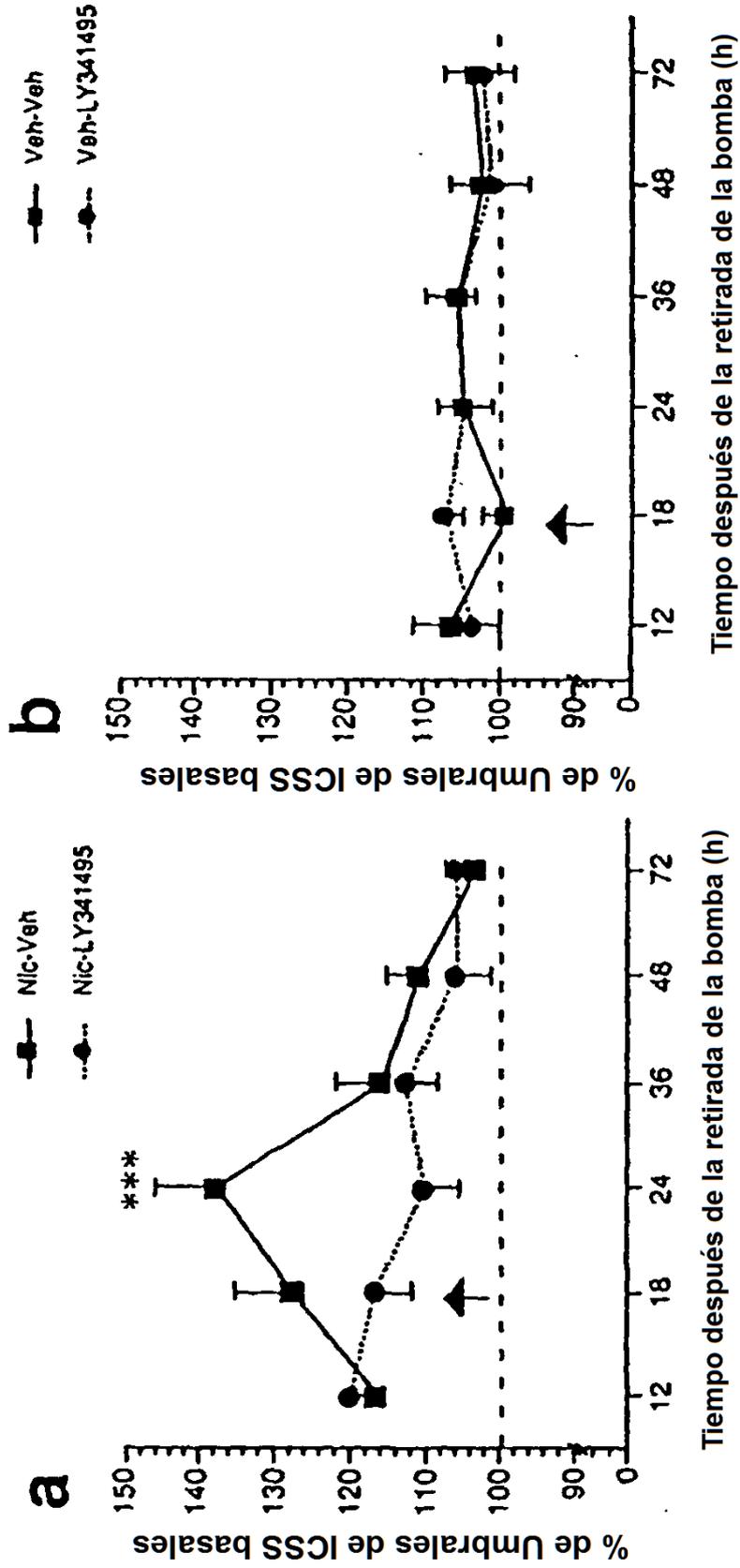


FIGURA 4

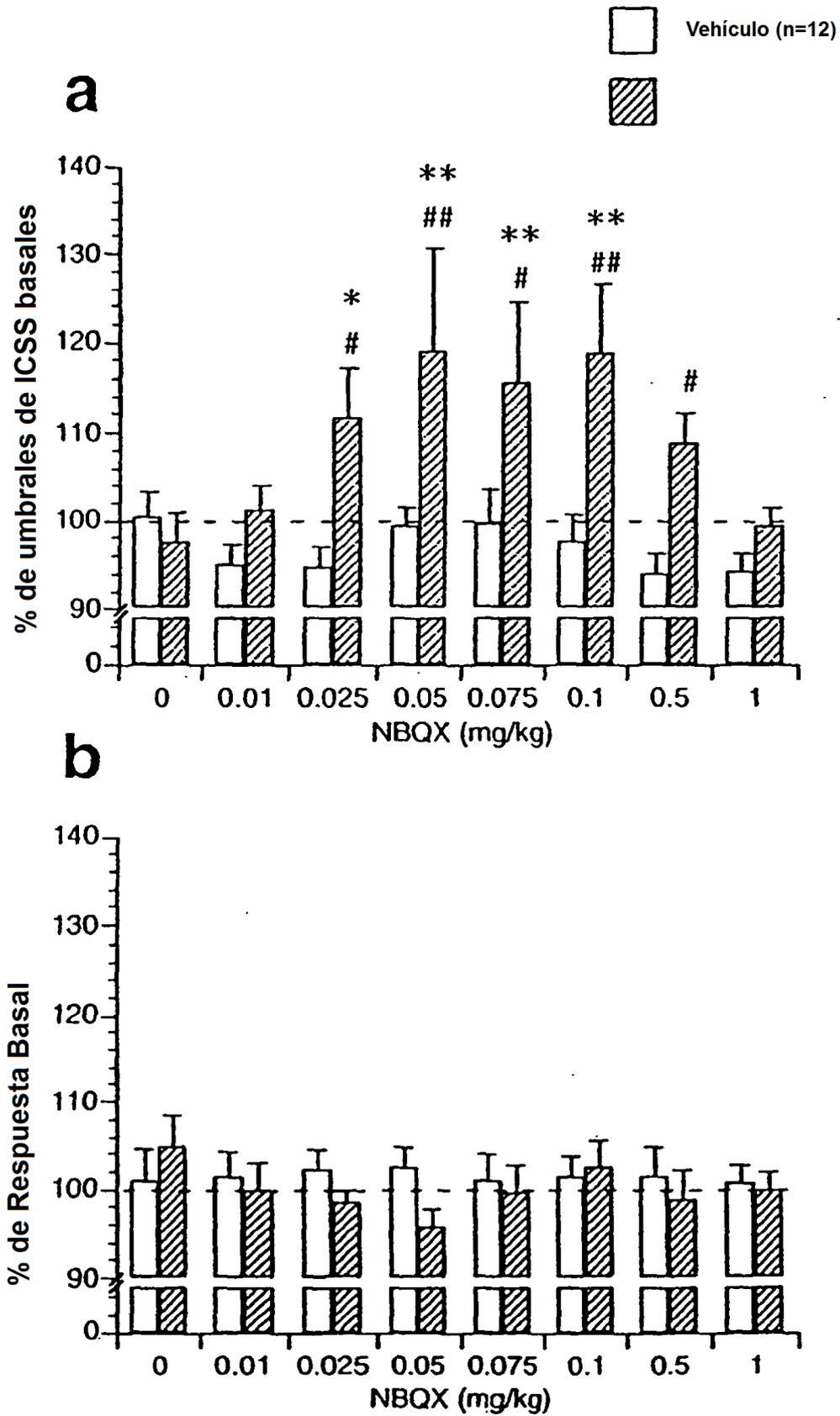


FIGURA 5

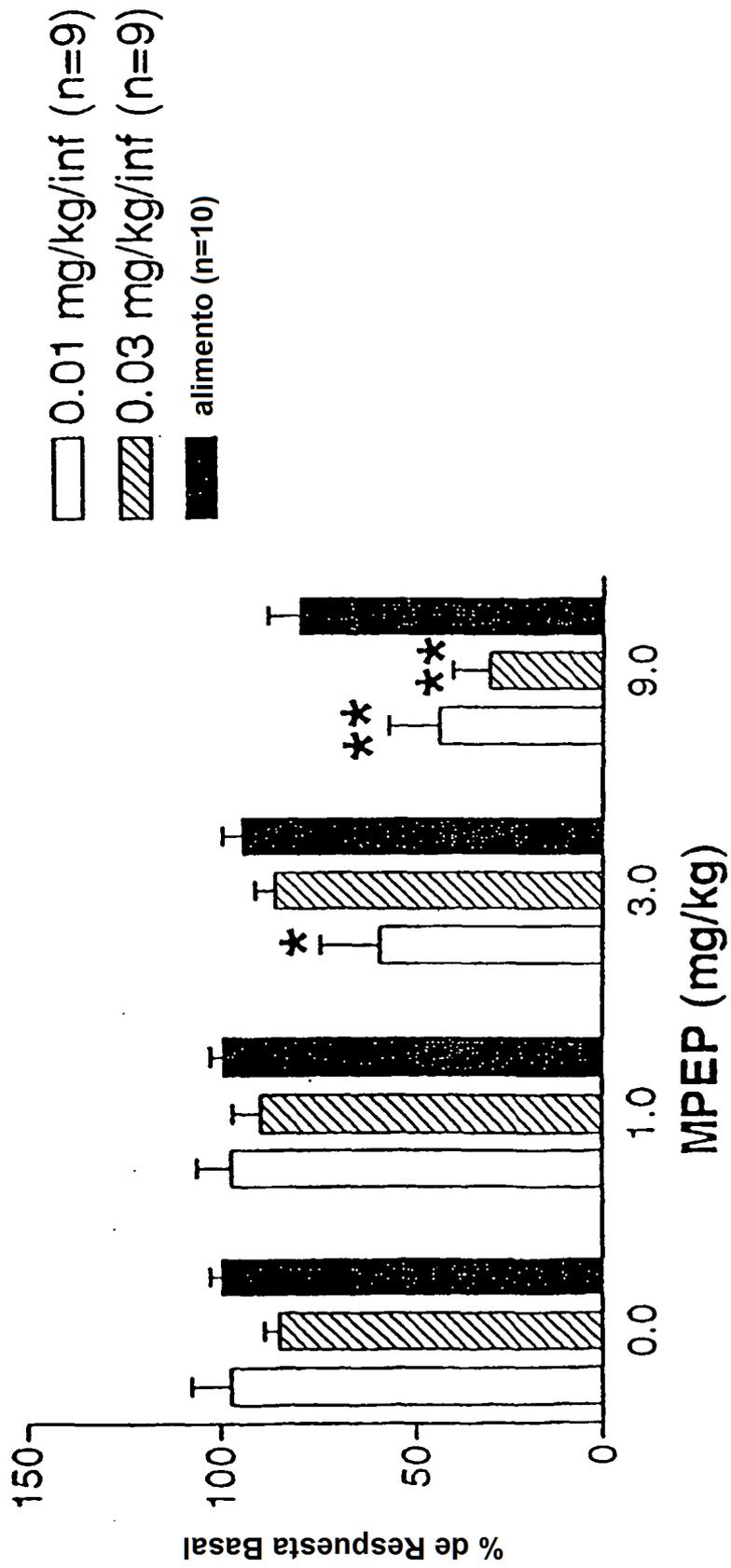


FIGURA 6

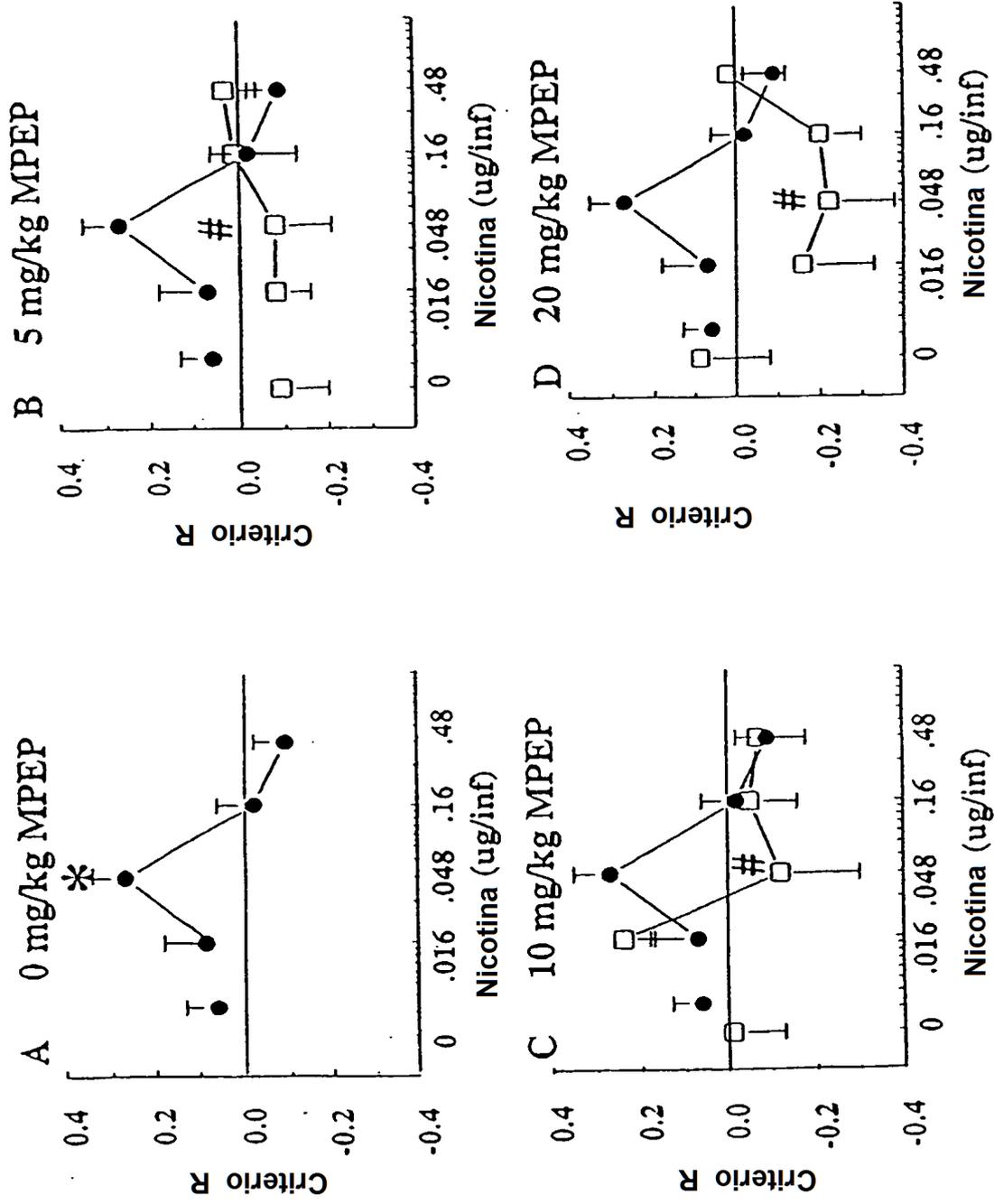


FIGURA 7

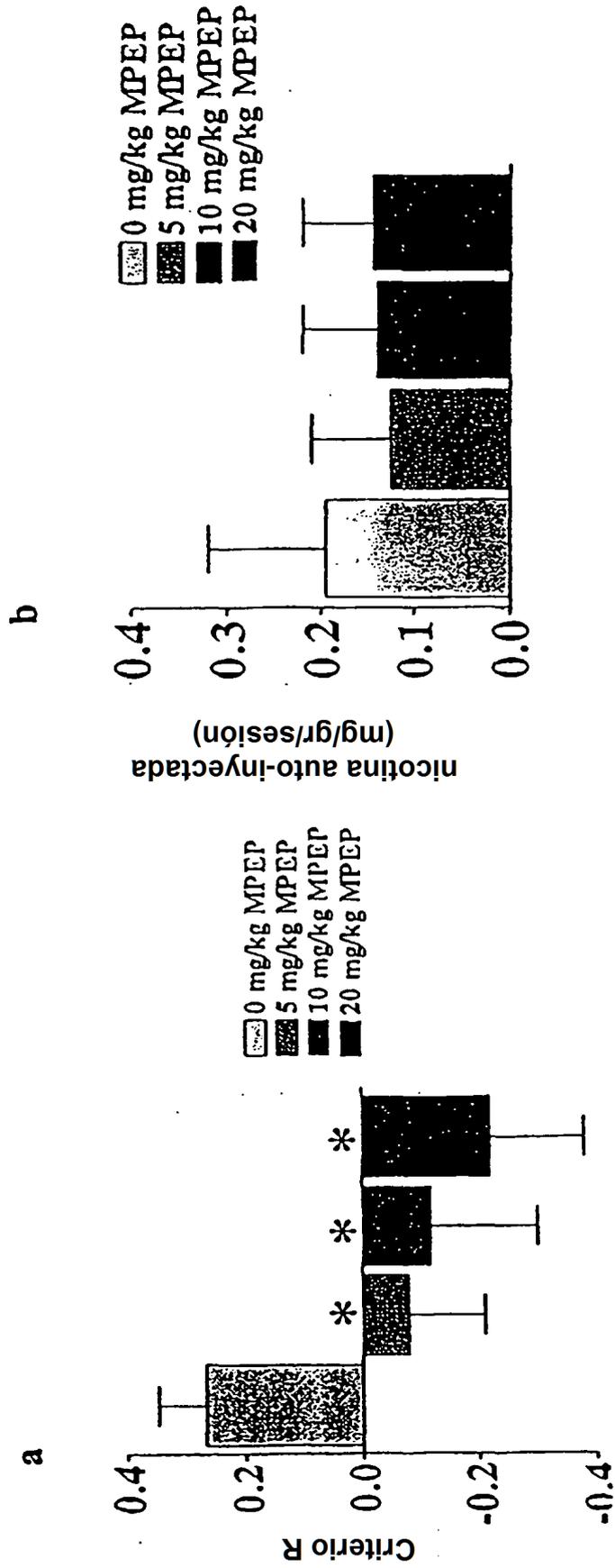


FIGURA 8

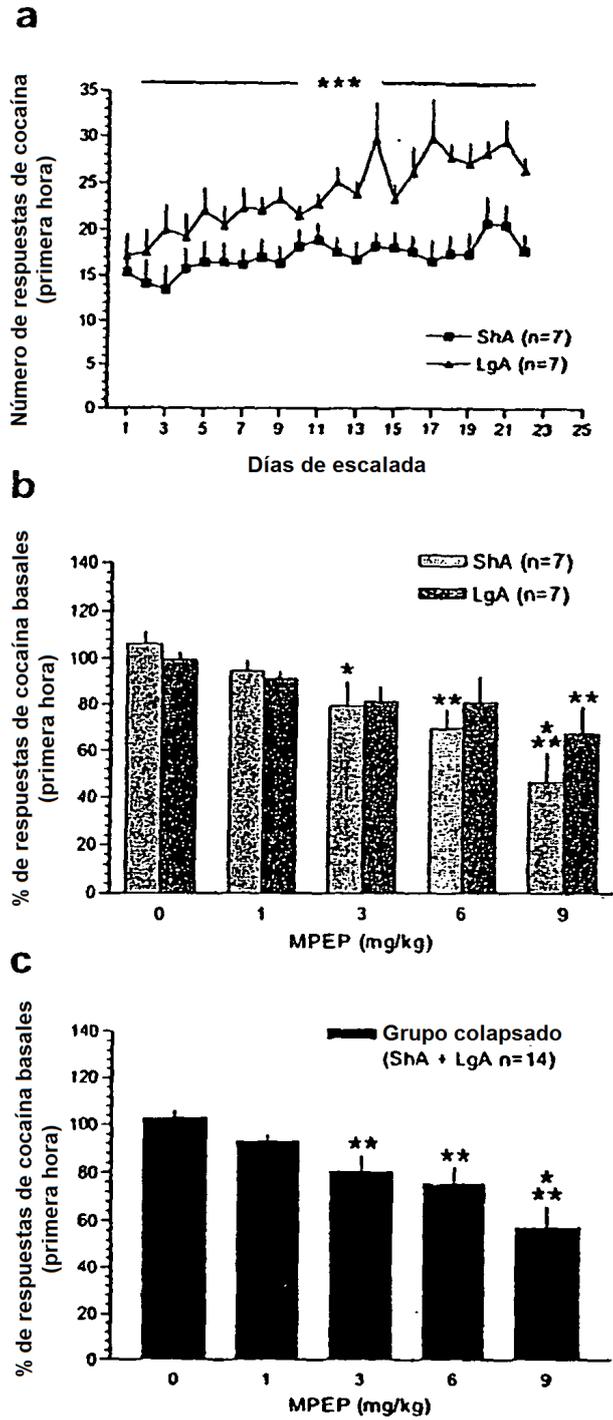


FIGURA 9

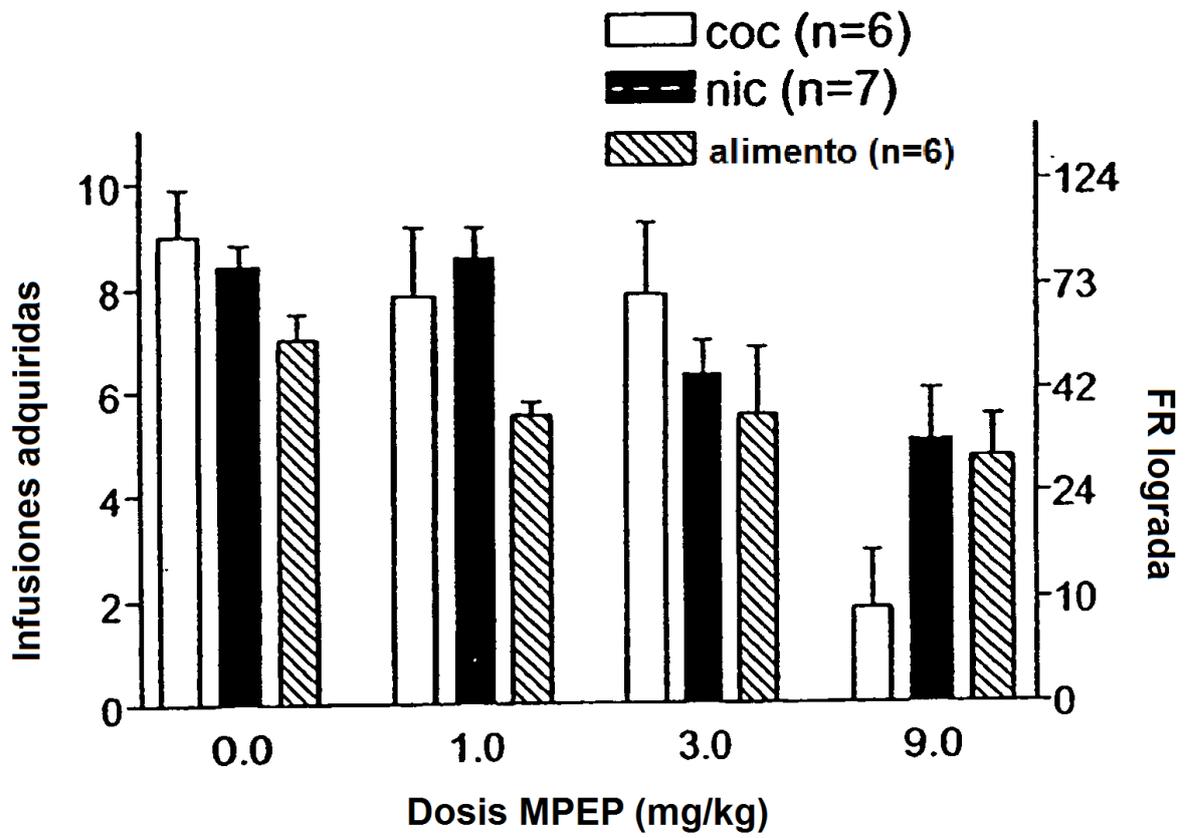


FIGURA 10

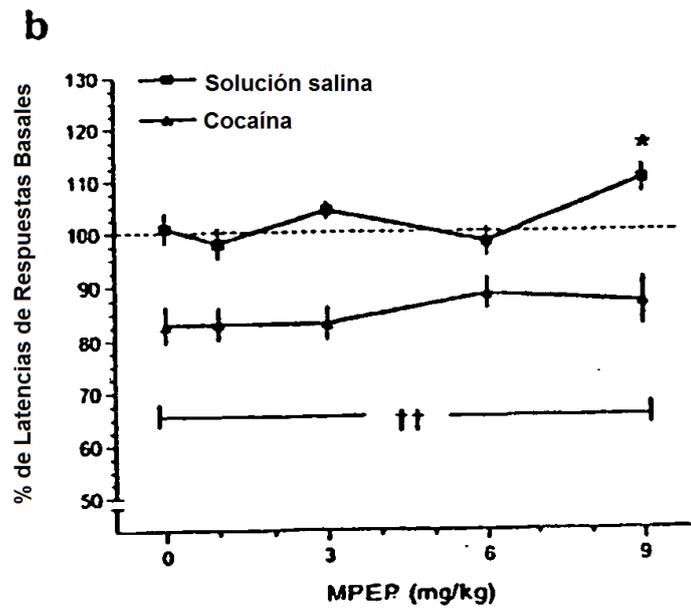
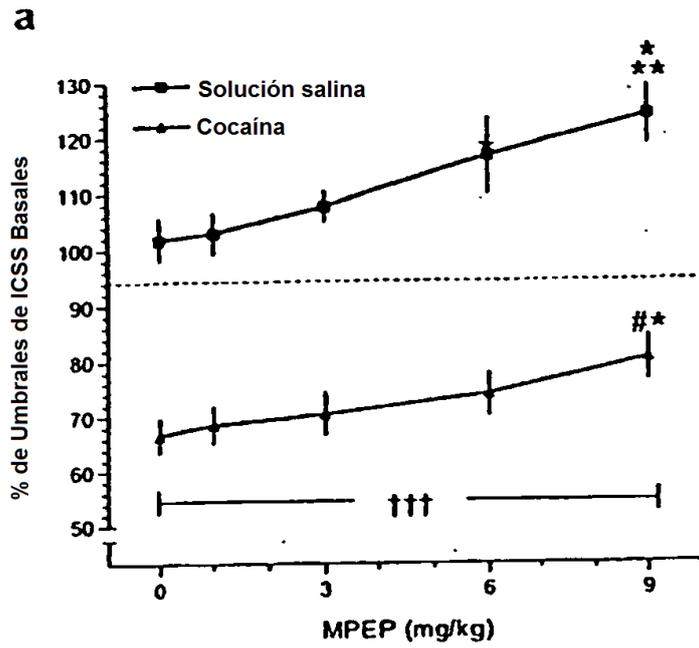
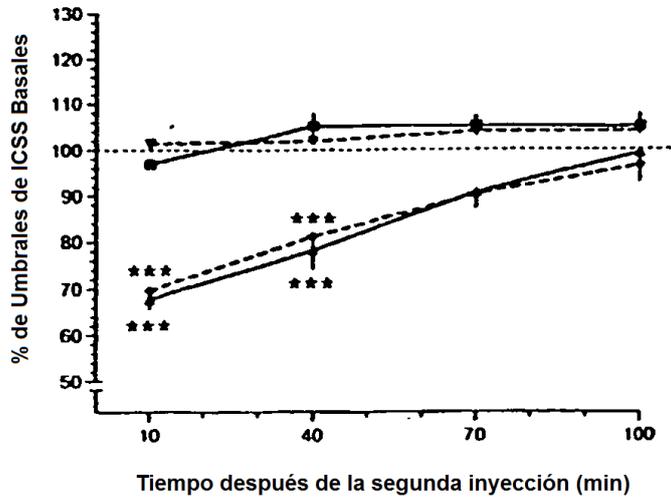


FIGURA 11

a



b

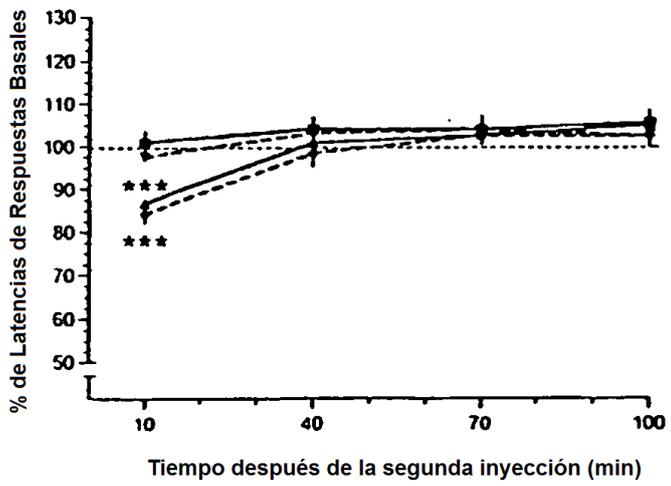


FIGURA 12

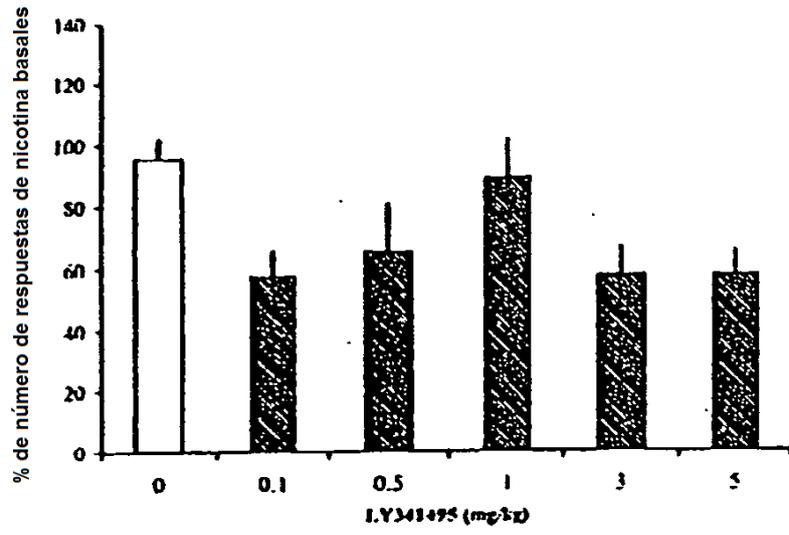


FIGURA 13

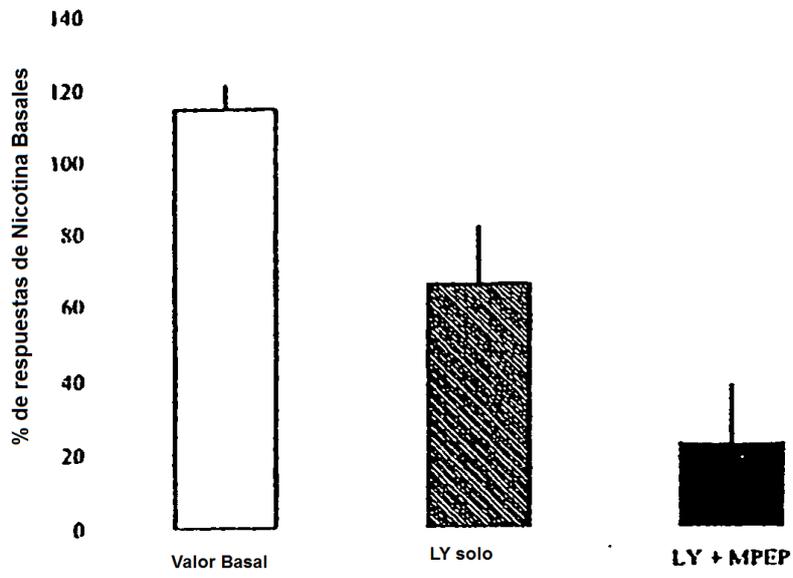


FIGURA 14

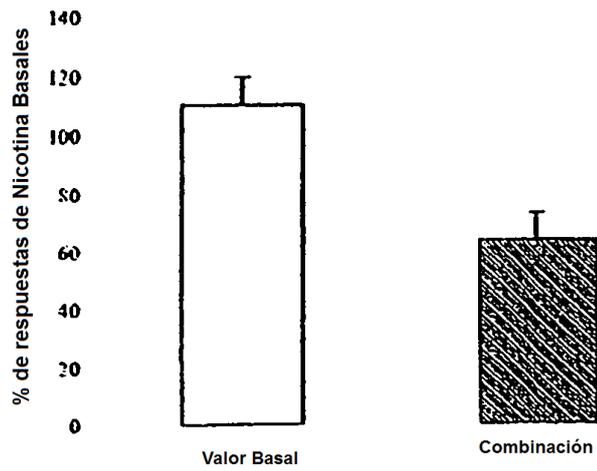


FIGURA 15

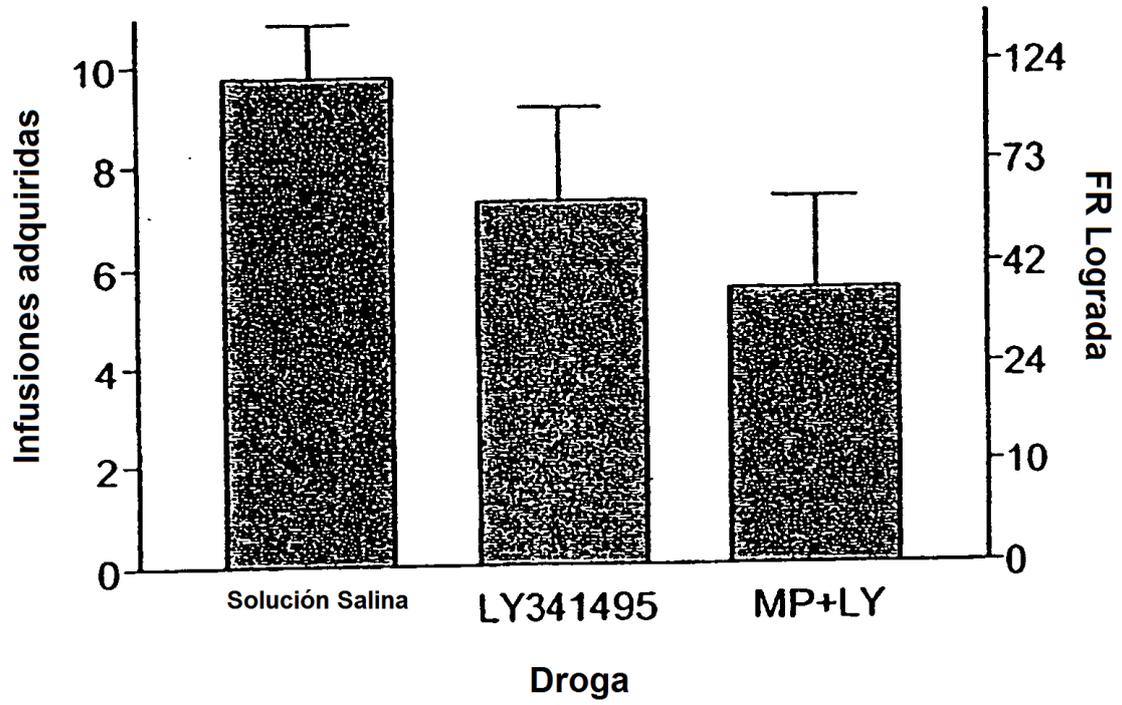


FIGURA 16